

Untersuchung zur Stärke systemischer und lokaler
inflammatorischer Reaktionen bei der Ratte nach
Stimulation mit spezifischen Agonisten der
endosomalen Toll-like Rezeptoren 7 und 9

FLORIAN WIEGAND

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

**Untersuchung zur Stärke systemischer und lokaler inflammatorischer
Reaktionen bei der Ratte nach Stimulation mit spezifischen Agonisten
der endosomalen Toll-like Rezeptoren 7 und 9**

INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus- Liebig- Universität Gießen

eingereicht von

Florian Wiegand

Tierarzt aus Frankfurt am Main

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus- Liebig- Universität Gießen

Dekan des Fachbereiches: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:
Prof. Dr. Joachim Roth
Prof. Dr. Sabine Wensch

Tag der Disputation: 20.01.2012

I may not have gone where I intended to go,
but I think I have ended up where I needed to be.

Douglas Adams

Abkürzungsverzeichnis

*	Signifikant, $p < 0,05$
°C	Grad Celsius
AA	Arachidonsäure
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AG	Antigen
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse
AP	Area Postrema
AP-1	Activator Protein 1
APP	Akute- Phase Protein
APR	Akute- Phase Reaktion
BBB	Blut- Hirn- Schranke, Blood- Brain Barrier
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Zyklooxygenase
CpG	Cytosin-phosphat-Guanin
CSF	Cerebro-Spinal-Flüssigkeit
CVO	Zirkumventrikuläres Organ
Cy3	Rotfluoreszierendes Carbocyanin
Da	Dalton
DAMs	Damage Associated Molecular Patterns
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Diacetat, Kernfärbung
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat

- Abkürzungsverzeichnis -

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
gp	Glykoprotein
HPA	Hypothalamus-Hypophysen Achse
Hz	Frequenz in Hertz
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IP	Intraperitoneal
IRAK	IL-R-associated kinase
IRF	IFN Regulatory Factor
IU	Internationale Einheiten
IκB	Inhibitorischer Faktor κB
JAK	Janus Kinase
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KFA	Komplettes Freund Adjuvans
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht

- Abkürzungsverzeichnis -

KM	Körpermasse
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin rich repeat
M	Molar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min.	Minuten
ml	Milliliter
mPGES	mikrosomale Prostaglandin E-Synthase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-Diphenyl-Tetrazolium- bromid
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Protein
n	Anzahl der Versuchstiere
n.d.	nicht detektierbar (unterhalb der Nachweisgrenze)
NaCl	Natriumchlorid
NDS	Normal Donkey Serum
NF-IL6	Nuclear Factor-IL6
NF-κB	Nuclear Factor-κB
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
p.i.	post injectionem
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

- Abkürzungsverzeichnis -

pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PRR	Pattern Recognition Receptors
QRT-PCR	Quantitative real-time PCR
RIP	Receptor-Interacting Protein
RNA	Ribonucleic Acid
S.E.M.	Standard Error of the Mean
SC	Subkutan
sCVO	sensorisches Zirkumventrikuläres Organ
SFO	Organum subfornicale
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
Solvent	Lösungsmittel
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
t	Zeit in Minuten
T _{abd.}	Körperkerntemperatur, Abdominaltemperatur
TAK	Transforming Growth Factor- β -Activating Kinase
TBK	TANK-Binding Kinase
TGF	Transforming Growth Factor
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	TIR-Domaincontaining Adaptor Protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
TRIF	TIR-Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN β

- Abkürzungsverzeichnis -

UV	Ultraviolett
vW	Von-Willebrand-Faktor, Endothelmarker
ZNS	Zentralnervensystem
Δ	Differenz
μg	Mikrogramm

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	13
1.1	Angeborene Immunität.....	13
1.1.1	Komponenten des angeborenen Abwehrsystems.....	13
1.1.2	Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMPs).....	13
1.1.3	Toll-like Rezeptoren.....	14
1.1.4	Die endosomalen TLRs 7 und 9.....	18
1.1.5	Die Bedeutung der TLRs für die schnelle Induktion unspezifischer Krankheitssymptome.....	19
1.2	Signalwege zur Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome.....	20
1.2.1	Die besondere Bedeutung sensorischer zirkumventrikulärer Organe (sCVOs) bei der humoralen Signalübertragung.....	20
1.2.2	Alternative Signalübertragung	22
1.3	Potentielle Mediatoren zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome in der Peripherie.....	23
1.3.1	Zytokine	23
1.3.2	Prostaglandine	28
1.4	Potentielle Mediatoren zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome im Gehirn.	29
1.4.1	Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.....	29
1.4.2	Zytokinbildung im Gehirn	31
1.4.3	Induzierbare Enzyme der Prostaglandinsynthese.....	31
1.5	Ziele und Fragestellungen.....	32
2	Material und Methoden.....	34
2.1	Geräte- und Materialliste I.....	34
2.2	In vivo Versuche.....	35
2.2.1	Geräte- und Materialliste II.....	35

2.2.2 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	36
2.2.3 Operation und Operationsvorbereitung.....	36
2.2.3.1 Narkose und Prämedikation.....	36
2.2.3.2 Implantation des Radiotransmitters.....	36
2.2.3.3 Der Radiotransmitter.....	37
2.2.3.4 Erzeugen einer subkutanen Luftblase („airpouch“)......	38
2.2.3.5 Nachsorge.....	38
2.2.4 Verwendete Substanzen (TLR Agonisten).....	38
2.2.4.1 Imiquimod – R837.....	38
2.2.4.2 ODN 1668.....	40
2.2.5 Telemetrie.....	41
2.2.5.1 Aufzeichnung von Körpertemperatur, motorischer Aktivität, Futter- und Wasseraufnahme.....	41
2.2.5.2 Statistik und Auswertung der telemetrischen Daten.....	42
2.2.6 Organentnahme für PCR und Immunhistochemie.....	43
2.2.6.1 Geräte- und Materialliste III.....	43
2.2.6.2 Transkardiale Perfusion.....	43
2.2.6.3 Aufbereitung von Blut- und Lavageproben.....	44
2.3 Molekulare Untersuchungen.....	45
2.3.1 Plasmaprobenanalyse.....	45
2.3.1.1 Geräte- und Materialliste IV.....	45
2.3.1.2 Nachweismethoden für Zytokine (ELISA vs. Bioassay).....	46
2.3.1.3 IL-6 Bioassay.....	47
2.3.1.4 TNF α Bioassay.....	50
2.3.1.5 IFN γ ELISA.....	51
2.3.1.6 Statistik und Auswertung der Zytokindaten.....	52
2.3.2 Schneiden der Organe am Gefriermikrotom (Kryostat).....	52

2.3.3	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (QRT-PCR).....	53
2.3.3.1	Geräte- und Materialliste V.....	53
2.3.3.2	Grundlagen.....	54
2.3.3.3	Versuchsprotokoll und Auswertung der PCR Daten.....	57
2.3.4	Immunhistochemie.....	61
2.3.4.1	Geräte- und Materialliste VI.....	61
2.3.4.2	Grundlagen.....	62
2.3.4.3	Versuchsprotokoll und Auswertung der Immunhistologischen Daten.....	64
3	Ergebnisse.....	67
3.1	Lokale und systemische Stimulation mit dem TLR 7 Agonisten Imiquimod.....	67
3.1.1	Telemetrische Daten.....	67
3.1.1.1	Körpertemperatur.....	68
3.1.1.2	Motorische Aktivität.....	70
3.1.1.3	Futter- und Wasseraufnahme.....	71
3.1.1.4	Körpergewicht.....	73
3.1.2	Molekulare Untersuchungen.....	75
3.1.2.1	Expressionsmuster von Interferonen in Leber und Milz auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR.....	75
3.1.2.2	Zytokin Gehalt in Plasma- und Lavageproben.....	79
3.1.2.3	Expressionsmuster relevanter inflammatorischer Signalmoleküle im Hypothalamus auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR.....	82
3.1.2.4	Expressionsmuster relevanter inflammatorischer Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene mittels Immunhistochemie.....	88
3.2	Lokale und systemische Stimulation mit dem TLR 9 Agonisten ODN 1668.....	95
3.2.1	Telemetrische Daten.....	95
3.2.1.1	Körpertemperatur.....	96
3.2.1.2	Motorische Aktivität.....	99

3.2.1.3	Futter- und Wasseraufnahme.....	100
3.2.1.4	Körpergewicht.....	103
3.2.2	Molekulare Untersuchungen.....	103
3.2.2.1	Expressionsmuster von Interferonen in Leber und Milz auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR.....	103
3.2.2.2	Zytokin Gehalt in Plasma- und Lavageproben.....	106
3.2.2.3	Expressionsmuster relevanter inflammatorischer Signalmoleküle im Hypothalamus auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR.....	108
3.2.2.4	Expressionsmuster relevanter inflammatorischer Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene mittels Immunhistochemie.....	113
3.3	Zusammenfassende Betrachtung der endosomalen TLR 7 und 9 Agonisten und ihrer Wirkung.....	118
4	Diskussion.....	119
4.1	ZentralNervös kontrollierte Krankheitssymptome nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Stimulation mit endosomalen TLR Agonisten.....	119
4.2	Periphere Zytokininduktion nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Stimulation mit endosomalen TLR Agonisten.....	122
4.3	Effekte endosomaler TLR Agonisten auf das Gehirn (CVOs / Hypothalamus)....	124
4.3.1	Ein zusätzlicher, alternativer Signalweg nach lokaler (SC) Stimulation mit TLR 7 und 9 Agonisten.....	127
4.4	Therapeutisches Potential von endosomalen TLR Agonisten.....	129
5	Zusammenfassung.....	130
6	Summary.....	132
7	Literaturverzeichnis.....	134
8	Anhang.....	155
8.1	Danksagung.....	155
8.2	Erklärung.....	155

1 EINLEITUNG

1.1 ANGEBORENE IMMUNITÄT

1.1.1 KOMPONENTEN DES ANGEBORENE ABWEHRSYSTEMS

Im Laufe der Evolution haben sich zwei eng miteinander kooperierende Systeme von Abwehrmechanismen entwickelt. Das eine Abwehrsystem ist von Geburt an vorhanden und wirkt unspezifisch über eine Vielzahl genetisch festgelegter Rezeptoren und mechanischer Barrieren. Es ist nicht in der Lage sich anzupassen und wird deshalb als nicht-adaptiv oder angeboren bezeichnet. Das adaptive oder spezifische Immunsystem hingegen basiert auf der Umlagerung von Rezeptorgenen, wodurch spezifisch für bestimmte Antigene passende Antigenrezeptoren produziert werden (Konat et al., 2006). Da es einige Tage dauert, bis das adaptive Immunsystem effektiv gegen Pathogene agiert, stellt das angeborene Immunsystem eine unverzichtbare erste Verteidigungslinie dar.

Der erste Teil des angeborenen Immunsystems wird durch die äußeren Barrieren des Körpers, also Haut und Schleimhäute sowie den von ihnen abgesonderten Drüsensekreten gebildet. Diese erzeugen einen pH-Wert zwischen drei und fünf, was ausreicht, um viele pathogene Bakterien an der Besiedlung zu hindern. Speichel und Tränen enthalten Lysozym, ein bakterizides Protein, das bakterielle Zellwände verdaut. Ist die Haut intakt, stellt sie für Krankheitserreger eine unüberwindbare Barriere dar. Allerdings reichen schon kleinste Verletzungen, um Erregern den Eintritt in den Organismus zu ermöglichen.

Der zweite Teil des angeborenen Immunsystems befindet sich im Körperinneren, wird durch chemische Signale aktiviert und umfasst vor allem Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen (Akira & Hemmi, 2003) sowie bakterizide Proteine (Komplement). Im Gegensatz zur Antigenspezifität der Effektorzellen des adaptiven Immunsystems erkennt das angeborene Immunsystem PAMPs („Pathogen Associated Molecular Patterns“), die größeren Gruppen von Pathogenen gemeinsam sind, durch verschiedene PRR („Pattern Recognition Receptors“).

1.1.2 PATHOGEN-ASSOZIIERTE MOLEKÜLE (PAMPs)

PAMPs („Pathogen Associated Molecular Patterns“) sind molekulare Strukturen von Pathogenen, die hochkonserviert, d.h. sehr beständig sind, da sie für das Pathogen eine essenzielle Rolle bei Zellteilung, Erhalt der Homöostase, Strukturbildung und anderen Stoffwechselvorgängen spielen. PAMPs sind grösseren Gruppen von Pathogenen gemeinsam, kommen im Wirtsorganismus nicht vor und können so schnell durch Zellen des angebore-

nen Immunsystems in der Peripherie oder direkt durch Zellen der CVOs im Gehirn (siehe Kap. 1.2.1) erkannt werden (Ott et al., 2010; Schnare et al., 2006). Das bekannteste PAMP ist LPS (Lipopolysaccharid) aus der Zellwand gram-negativer Bakterien, das manchmal auch als Endotoxin bezeichnet wird, und starke Krankheitssymptome auslösen kann.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, das angeborene Immunsystem rasch aktivieren zu können, stellt sich die Frage nach ihrer therapeutischen Einsetzbarkeit. So werden PAMPs als Adjuvantien gezielt eingesetzt, um die Immunreaktion des Organismus unspezifisch, z.B. nach einer Impfung, zu verstärken. Ein bekanntes Beispiel ist KFA (Komplettes Freund Adjuvans), das hitzeinaktivierte Mykobakterien enthält (Shimizu et al., 2008), bei deren PAMPs es sich um diacylierte Lipopeptide wie Makrophagen aktivierendes Lipopeptid-2 (MALP-2) oder Fibroblasten-stimulierendes Lipopeptid-1 (FSL-1) handelt (Greis et al., 2009; Greis et al., 2007; Hübschle et al., 2006; Knorr et al., 2008, Knorr et al., 2010). Diese aktivieren Phagozytose und Lymphozyten und verstärken so die gewünschte Immunreaktion. Die durch KFA ausgelösten Nebenwirkungen (Abszesse, Granulome, Schmerzhaftigkeit der Injektionsstelle, Fieber) sind allerdings erheblich. Es existiert eine Reihe kommerziell erhältlicher, alternativer Adjuvantien, die sich von KFA ableiten und deutlich weniger Nebenwirkungen haben. Sie beinhalten nicht vollständige Mykobakterien, sondern nur noch deren Zellwandbestandteile, Bestandteile von Corynebakterien oder Nocardien (Azuma, 1992; Chedid, 1983). In neueren Studien werden die erwähnten mykoplasmen Lipopeptide auch in gereinigter Form als Adjuvantien zur Tumorbekämpfung eingesetzt (Akazawa et al., 2010).

1.1.3 TOLL-LIKE REZEPTOREN

Bei *Drosophila melanogaster* wurden schon vor einigen Jahrzehnten Toll-Rezeptoren beschrieben, die neben der dorsoventralen Musterbildung eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr spielen (Lemaitre, 1993). Nach Stimulation mit dem extrazellulären Toll Liganden „Spätzle“ initiieren sie die Produktion des antifungalen *Drosomycins* und schützen die Fliege funktional vor Infektionen mit *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre et al., 1996). Die 1997 erstmals beschriebenen homologen Rezeptoren der Säugetiere, welche „Toll-like“ genannt wurden, steuern Funktionen der Abwehr indem sie PAMPs an der Zelloberfläche oder intrazellulär binden, und eine Signalkaskade in Gang setzen, die zur Stimulation des angeborenen Immunsystems führt (Conti et al., 2004; Medzhitov et al., 1997; Strober et al., 2006).

Bei Säugetieren sind dreizehn verschiedene TLRs, mit zum Teil noch unbekannten Liganden, nachgewiesen worden (Tab. 1) (Akira & Takeda, 2004; Shi et al., 2010). Sie gehören zusammen mit anderen Rezeptortypen zur Gruppe der PRR und agieren einzeln, als homo- oder heterodimer.

Rezeptor	Exogener Ligand	Synthetisches Molekül	Endogener Ligand
<i>TLR 1 / TLR 2</i>	<i>Triacylierte Lipopeptide aus Mykobakterien Zymosan / Hefen Glykosylphosphatidyl inositol Proteine aus T. cruzi (parasitär)</i>		
<i>TLR 2 / TLR 2</i>	<i>Homodimere deren Liganden bisher noch unbekannt sind</i>		
<i>TLR 2 / TLR 6</i>	<i>Diacylierte Lipopeptide, LTA Peptidoglycan (bakteriell) Zymosan / Hefe Glykosylphosphatidyl inositol Proteine aus T. Cruzi (parasitär)</i>		
<i>TLR 3</i>	<i>dsRNA (viral)</i>		
<i>TLR 4</i>	<i>LPS (bakteriell)</i>	<i>Taxol</i>	<i>Hsp60, Hsp70, Hyaluronsäure, Heparin sulfat, Fibrinogen</i>
<i>TLR 5</i>	<i>Flagellin (bakteriell)</i>		

Rezeptor	Exogener Ligand	Synthetisches Molekül	Endogener Ligand
<i>TLR 7</i>	<i>ssRNA (viral)</i>	<i>Imidazoquinolone, Loxoribine</i>	
<i>TLR 8</i>	<i>ssRNA (bakteriell)</i>	<i>Imidazoquinolone</i>	
<i>TLR 9</i>	<i>CpG (bakteriell und viral)</i>		
<i>TLR 10</i>	<i>Liganden bisher noch unbekannt</i>		
<i>TLR 11</i>	<i>Pathogene Bakterien des Urogenitaltrakts T. gondi profilin (parasitär)</i>		
<i>TLR 12</i>	<i>Liganden bisher noch unbekannt</i>		
<i>TLR 13</i>	<i>Liganden bisher noch unbekannt</i>		

Tab. 1: Liste der bisher bekannten TLRs, ihrer Liganden und deren Ursprung.

Die Bedeutung der TLRs bei der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome wird deutlich, wenn man Mäuse betrachtet, die eine Punktmutation im TLR 4 Gen aufweisen. Diese zeigen nach Stimulation mit LPS keine entzündliche Reaktion (Poltorak, 1998).

Eine Vielzahl von Zelltypen exprimieren TLRs in verschiedenen Organsystemen. Sie wurden im Epithel des Gastrointestinaltraktes, der Bronchien und des Urogenitaltraktes (Hornet et al., 2003; Muir et al., 2004; Zhang et al., 2004), im Gefäßendothel und an Zellen der Blut-Hirn-Schranke, sowie auf neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen, Mastzellen, B-Zellen und Monozyten nachgewiesen (Hopkins & Sriskandan, 2005).

TLR sind Typ1-Transmembran-Rezeptoren, die aus einer extrazellulären LRR („leucin-rich repeat“) Domäne, und einer intrazellulären TIR (Toll/IL-1) Domäne, bestehen (Abb. 1). Die LRR Domäne ist in die Ligandenerkennung, die Signaltransduktion sowie die Dimerisation der TLRs involviert (Kobe & Deisenhofer, 1995). Die TIR Domäne, die große Homologie mit dem intrazellulären Anteil des IL-1 Rezeptors aufweist, ist für die intrazelluläre Signal-

weiterleitung verantwortlich und besteht aus ca. 200, zwischen den einzelnen TLR variierenden, Aminosäuren (Akira & Takeda, 2004). Sie rekrutiert nach ihrer Aktivierung Adapterproteine, wie MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TRIF (TIR- domain-containing adaptor-inducing IFN β), TRAM (TRIF-related adaptor molecule) oder TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein)(Abb. 2).

Der von den meisten TLRs induzierte schnelle, MyD88 abhängige Signalweg verläuft über die Phosphorylierung von IRAK 1 und 4 (IL-R-associated kinase) zu deren Assoziation mit TRAF6 (tumor necrosis factor receptor associated factor Adapterprotein 6). Dieses aktiviert TAK1 (transforming growth factor- β -activating kinase) wodurch weitere Kinasen aktiviert werden, die zur nukleären Translokation verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (nuclear factor- κ B) führen (siehe Kap. 1.4.1).

Der langsamere, MyD88 unabhängige Signalweg welcher TRIF als Adapterprotein verwendet, wird durch TLR 3, aber auch parallel zum MyD88 abhängigen Signalweg, durch TLR 4, aktiviert (Alexopoulou et al., 2001; Kawai & Akira, 2005).

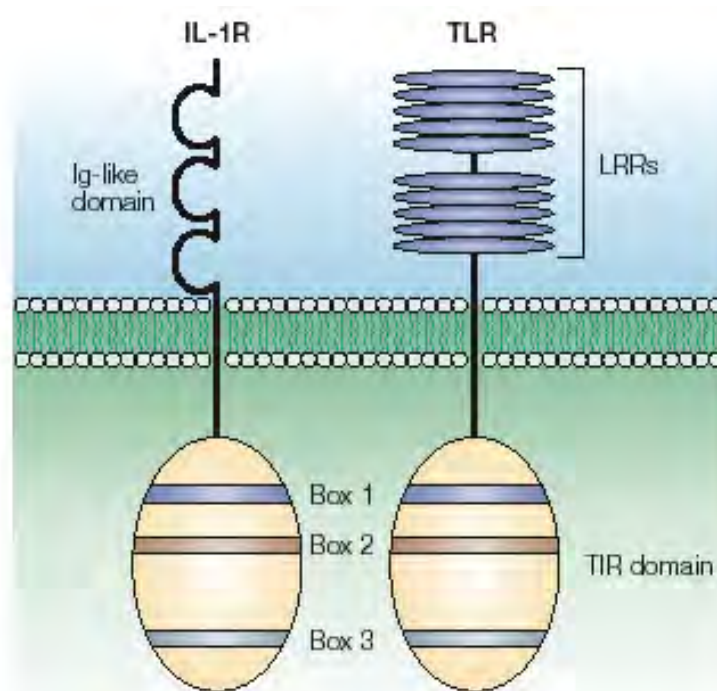


Abb. 1: Vergleichende Darstellung von IL-1 und Toll-like Rezeptor. Die zytoplasmatische TIR Domäne ist charakterisiert durch drei hochkonservierte Regionen (Box 1, 2 und 3) die in beiden Rezeptortypen analog aufgebaut sind. In der extrazellulären Domäne weisen TLR leucinreiche Wiederholungen (LRR), der IL-1 Rezeptor drei Immunglobulin ähnliche Domänen auf. Abbildung aus Akira & Takeda, 2004.

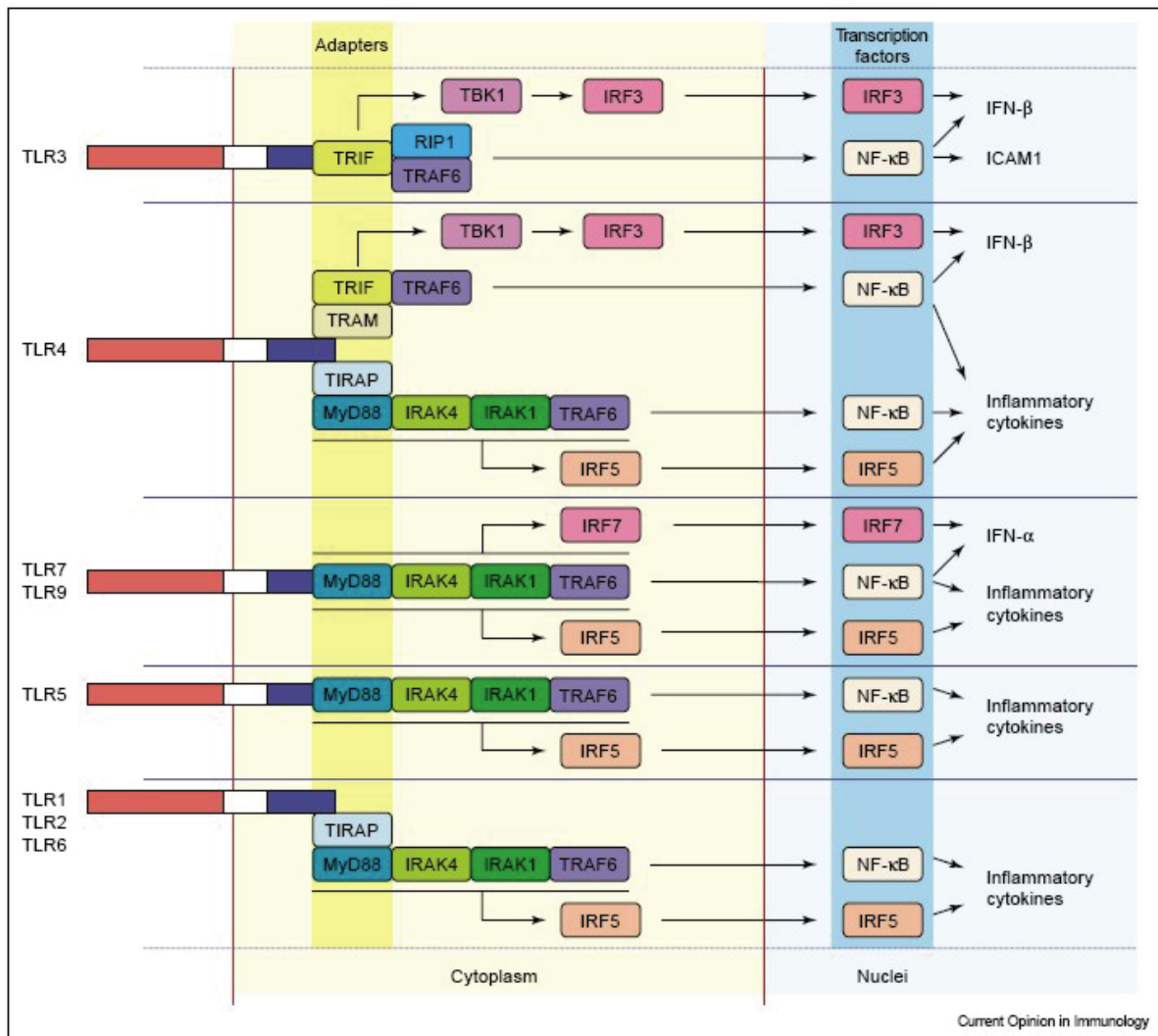


Abb. 2: Schematische Darstellung der spezifischen TLR Signalwege. Alle außer TLR 3 aktivieren den MyD88 abhängigen Signalweg der NF-κB aktiviert welches Gene induziert, die für inflammatorische Zytokine kodieren. Receptor-Interacting Protein-1 (RIP1), TANK-Binding Kinase 1 (TBK1), IFN regulatory factor 3 (IRF3), Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1). Weitere Abkürzungen: siehe Kap. 1.1.3 . Abbildung aus Kawai & Akira, 2005.

1.1.4 DIE ENDOSOMALEN TLRs 7 UND 9

Die grosse Diversität verschiedener Pathogene hat zur Entwicklung unterschiedlicher Pfade geführt, was ihre Erkennung durch das Immunsystem angeht. Diese richten sich in erster Linie danach, ob ein Pathogen vorzugsweise extrazellulär, zytoplasmatisch oder in einem endosomalen Kompartiment anzutreffen ist. TLRs 3, 7, 8 und 9 werden nicht auf der Zelloberfläche, sondern intrazellulär auf endosomalen Kompartimenten exprimiert (Kawai & Akira, 2005).

Ursprünglich ging man davon aus, dass endosomale TLRs Viren detektieren, die durch Rezeptor vermittelte Endozytose, Phagozytose, oder während ihres Vermehrungszyklus in

die Zelle gelangten und später zufällig oder während der „Knospung“ mit dem Endosom in Kontakt kamen. Mittlerweile wurde gezeigt, dass TLR 9 CpG-Motive bakterieller DNA, dsDNA Viren (z.B. MCMV, HSV 1 und 2) sowie Genomanteile von Protozoen (z.B. *Trypanosoma cruzi*), bindet. Wichtiger als die genaue Struktur des Moleküls scheint die Lokalisation des PAMP im Endolysosom zu sein. TLR 7 bindet Imidazoquinolon Derivate, Guanosin Analoga, Guanosin reiche ssRNA (z.B. HIV, Influenza Virus, VSV) und bakterielle Anteile (z.B. *Borrelia burgdorferi*). Weiter sind die oben genannten TLR in der Lage, nicht nur „fremde“, sondern auch „eigene“ Nukleinsäuren, die im Rahmen von Gewebeschädigung entstanden sind, sogenannte DAMs (Damage Associated Molecular Patterns), zu binden (Miyake, 2007).

Reifung und Ansäuerung des Endosoms sind für den weiteren Prozess von entscheidender Bedeutung. Unterbindet man die Ansäuerung des Endolysosoms, unterbricht man ebenfalls die TLR vermittelten Reaktionen (Häcker et al., 1998). Innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums sorgt gp96 für die richtige Faltung der endosomalen TLR. Diese werden über den Golgi Apparat zu den Endosomen gelenkt. Dort wird ein Teil der LRR Domäne enzymatisch abgespalten, was die Affinität potentieller Liganden zum Rezeptor erhöht, für deren Bindung aber nicht zwingend erforderlich ist. Notwendig ist die Spaltung jedoch für die Interaktion des TLR mit MyD88 und die weitere Signaltransduktion (Blasius & Beutler, 2010).

1.1.5 DIE BEDEUTUNG DER TLRs FÜR DIE SCHNELLE INDUKTION UNSPEZIFISCHER KRANKHEITSSYMPTOME

Werden PAMPs durch TLR tragende Zellen detektiert, kommt es in diesen zur in Kap. 1.1.3 beschriebenen Signaltransduktion und letztlich zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Der Organismus besitzt so innerhalb von Minuten einen ersten effektiven Schutz gegen Pathogene, der sich im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem nicht erst durch relativ langwierige Prozesse entwickeln muss.

1.2 SIGNALWEGE ZUR INDUKTION ZENTRALNERVÖS KONTROLLIERTER KRANKHEITSSYMPTOME

1.2.1 DIE BESONDERE BEDEUTUNG SENSORISCHER ZIRKUMVENTRIKULÄRER ORGANE (sCVOs) BEI DER HUMORALEN SIGNALÜBERTRAGUNG

Bei den CVOs handelt es sich um Bereiche des die Ventrikelräume begrenzenden Ependyms, welche sich strukturell und funktionell von ihrer Umgebung unterscheiden und einen „organartigen Charakter“ (Nickel et al., 1992) besitzen. Eine wichtige Besonderheit der CVOs ist ihre Gefäßarchitektur. Im Gehirn sind zwischen den Endothelzellen der Gefäße „tight junctions“, auch *Zonae occludentes* genannt, ausgebildet, welche die Zellen eng miteinander verbinden und so ausschließlich Molekülen, deren Molekülmasse 90 Da nicht überschreiten, und deren Radius kleiner als 0,2 nm ist, den Durchtritt ermöglichen. Die Ausbildung dieser natürlichen Barriere zwischen ZNS und peripherem Blutkreislauf wird durch die gefäßumgebenden Astrozyten noch verstärkt. Funktion dieser auch als Blut-Hirn-Schranke (BBB) bezeichneten Barriere besteht in der Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn und dem Schutz desselben vor dem Eindringen potentiell schädlicher Substanzen.

Die stark vaskularisierten CVOs verfügen nun, neben direktem Kontakt zum cerebroventrikulären System, über eine Fenestrierung des Gefäßendothels, was zur funktionellen Durchlässigkeit der BBB führt („Window to the Brain“). So kommt das Parenchym des Gehirns im Bereich der CVOs mit Blut und den darin gelösten Inhaltsstoffen und Mediatoren direkt in Berührung. Besonderheit einiger CVOs ist die zusätzliche Beteiligung von Neuronenzellkörpern an der Zellpopulation, welche sich im übrigen aus Gliazellen, Dendriten und Neuronenaxonen zusammensetzt. Diese CVOs (Abb. 3) werden als sensorisch (sCVO) bezeichnet und umfassen das OVLT (*Organum vasculosum laminae terminalis*), das SFO (*Organum subfornicale*), die ME (*Eminentia mediana*) und die AP (*Area postrema*). Das OVLT mit seinem engmaschigen Kapillarnetz befindet sich in der Vorderwand des III. Ventrikels zwischen dem *Chiasma opticum* und der *Commissura rostralis*. Die AP liegt in der *Medulla oblongata* in Nachbarschaft zum vierten Ventrikel, am kaudalen Ende der Rautengrube und bildet dort einen Anteil des dorsalen Vaguskomplexes (Nickel et al., 1992).

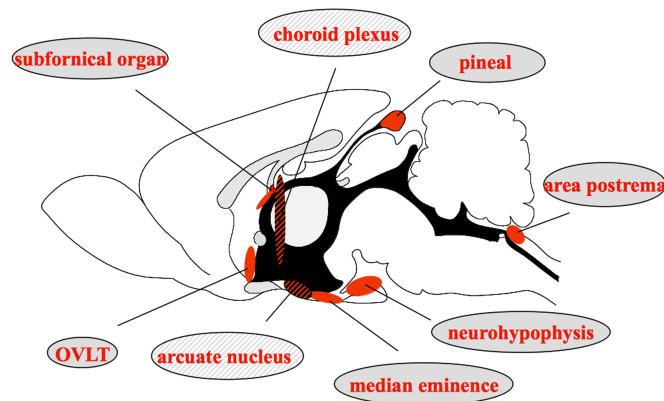


Abb. 3: Sagittalschnitt durch ein stilisiertes Rattengehirn. Die CVO sind farbig eingezeichnet.

Durch Detektion hämatogener Hormone leisten die sCVOs einen wichtigen Beitrag für Elektrolyt- und Flüssigkeitshomöostase (McKinley et al., 1999), die Regulation der Körpertemperatur und des kardiovaskulären Systems. Die AP ist darüber hinaus in die Kontrolle des Körpergewichtes sowie des Hungerempfindens eingebunden (Fry & Ferguson, 2007), was sie zu einer Zielstruktur für das infektionsbegleitende, temporäre Auftreten einer Anorexie macht. Bindungsstellen für Angiotensin II, Atriales Natriuretisches Peptid, Noradrenalin und Endothelin wurden in den sCVO nachgewiesen (Gebke et al., 2000; Gerstberger et al., 1992; Quirion et al., 1986).

Zur Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome sind Mediatoren nötig, die das Signal von der Peripherie ins ZNS „transportieren“. Diese Mediatoren sind unter anderem proinflammatorische Zytokine, die am Ort der Entzündung gebildet werden und dann im Blutkreislauf zirkulieren. Zytokine sind hydrophile Peptide mit einem Molekulargewicht von 15-25 kDa. Ihre Diffusion durch die intakte BBB ist unwahrscheinlich. Die Existenz aktiver, sättigbarer Transportmechanismen für IL-1, IL-6 und TNF α wurde bei Mäusen nachgewiesen (Banks et al., 1991; Banks et al., 1994; Gutierrez et al., 1993). Die Menge an Zytokinen, welche tatsächlich über solche aktiven Mechanismen in das Neuropil gelangen, ist jedoch mit 0,1% der zirkulierenden Gesamtmenge sehr gering (Banks et al., 1991). Dies legt nahe, dass die CVOs mit ihrem fenestrierten Endothel eine entscheidende Rolle bei der Kopplung von humoralem Signalmolekül und denen die Körpertemperatur steuernden thermosensitiven Neuronen einnehmen.

Mittlerweile gilt die Beteiligung der CVOs an der Fieberentstehung als gesichert (Roth et al., 2004). Besonderes Augenmerk sei hier auf das OVLT gerichtet, da es in unmittelbarer Nachbarschaft zu den für die Thermoregulation relevanten Kerngebieten der präoptischen

Region lokalisiert ist. Außerdem wurde demonstriert, dass Meerschweinchen nach elektrolytischer Ablation der anteroventralen Wand des dritten Ventrikels, welche das OVLT enthält, kein Fieber nach Stimulation mit LPS zeigten (Blatteis et al., 1983). Inzwischen konnten im Bereich der sCVOs Rezeptoren für mehrere pyrogene Mediatoren nachgewiesen werden. Der vermutlich für die humorale Übermittlung entscheidende IL-6 Rezeptor, sowie die signalvermittelnde Untereinheit (gp130), werden in allen sCVOs konstitutiv exprimiert (Vallières & Rivest, 1997). Nach intravenöser Gabe von TNF α wurde die vermehrte Expression der TNF α -p55-Rezeptor Untereinheit in OVLT, SFO und AP registriert. Der Nachweis des TNF α -p75-Rezeptors in den CVOs gelang bisher nicht (Nadeau & Rivest, 1999).

Rezeptoren für IL-1 β wurden, auch wenn es selbst bei systemischer Inflammation nur in geringen Mengen im Blut auftaucht, in Endothelzellen des OVLT, SFO und AP nachgewiesen. IL-1 scheint also bei der Steuerung der Fieberentstehung im Gehirn eine gewisse Rolle zu spielen (Cao et al., 2001; Cunningham et al., 1992; Ericsson et al., 1995). Man nimmt an, dass die zirkulierenden Zytokine, besonders IL-1 β , an Rezeptoren der Endothelzellen der CVOs binden, dort die Translokation von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B nach sich ziehen, was dann zur Transkription bestimmter Gene für Prostaglandine oder weitere Zytokine führt (Rivest et al., 2000).

1.2.2 ALTERNATIVE SIGNALÜBERTRAGUNG

Eine weitere Variante der Fieberinduktion stellt die neuronale Übertragung dar. Bei diesem Modell werden afferente Endigungen sensorischer Neurone durch ein Zytokin stimuliert und leiten den inflammatorischen Reiz in Form von Aktionspotentialen zum Gehirn. Dort könnte es zu einer intracerebralen Mediatorausschüttung und sogar zur induzierten Bildung von Zytokinen kommen (Roth & De Souza, 2001). Diese Überlegung entstand auf Grund der Tatsache, dass in der frühen Phase der Fieberantwort nach LPS Injektion zunächst keine Zytokine im Blutplasma zu detektieren sind, und somit diese frühe Fieberphase nicht humoral vermittelt sein kann (Blatteis, 2006).

Dem *Nervus vagus* wird in diesem Zusammenhang eine große Bedeutung zugeschrieben. So konnte bei vagotomierten Tieren ein Fehlen des „sickness behaviour“ nach Injektion von IL-1 β festgestellt werden (Bluthé et al., 1996). Auch eine Unterdrückung der Fieberantwort konnte bei vagotomierten Meerschweinchen und Ratten, nach Stimulation mit verschiedenen Pyrogenen, abhängig von der injizierten Dosis und Applikationsart beobachtet werden (Goldbach et al., 1997; Romanovsky et al., 1997; Sehic & Blatteis, 1996).

Bei einer lokalen Entzündung sind kutane Afferenzen an der Signalweiterleitung ins Gehirn beteiligt. Nach Injektion von LPS in eine subkutane Kammer bei Meerschweinchen konnte durch Gabe eines Lokalanästhetikums in das Entzündungsareal die Fieberantwort abgeschwächt werden (Ross et al., 2000). Der Einfluß dieses alternativen Signalwegs ist allerdings begrenzt und spielt nur bei lokalen inflammatorischen Prozessen eine Rolle. Überschreitet die Entzündungsreaktion ein gewisses Maß, so werden die neuronalen Signale von den humoralen überlagert (Zeisberger, 1999).

1.3 POTENTIELLE MEDIATOREN ZENTRALNERVÖS KONTROLLIERTER KRANKHEITSSYMPTOME IN DER PERIPHERIE

1.3.1 ZYTOKINE

Zytokine sind meist unter 25 kDa schwere Glycoproteine, die von verschiedenen Zellen produziert werden und auto- oder parakrin auf die Zelle selbst oder Zellen der Umgebung wirken. Einige Zytokine entfalten aber auch holokrine Wirkung. Die durch Zytokine vermittelten Wechselwirkungen zwischen Zellen sind extrem vielfältig und reichen von angeborener über adaptive Immunabwehr bis hin zur Hämatopoese. Nach ihrer Hauptfunktion können Zytokine in folgende Gruppen eingeteilt werden:

- entzündungsfördernd (z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6)
- entzündungshemmend (z.B. IL-10, IL-11, $\text{TGF-}\beta$)
- hämatopoesefördernd (z.B. IL-3, IL-5, G-CSF)
- immunregulatorisch (z.B. IL-2, $\text{IFN}\gamma$, $\text{TGF-}\beta$)
- antiinfektiös (z.B. $\text{IFN}\alpha$, IL-29, $\text{TNF}\alpha$)
- antiproliferativ (z.B. $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$)

Betrachtet man die von Makrophagen produzierten proinflammatorischen Zytokine, so fällt auf, dass jedes Zytokin verschiedene Effekte auslöst (Pleiotropie) und verschiedene Zytokine denselben Effekt haben können (Redundanz). Außerdem können, abhängig von der Kombination und dem zeitlichen Auftreten der Zytokine, verschiedene Effekte ausgelöst werden. Deshalb richtet sich die Klassifikation mittlerweile eher nach der Struktur der Moleküle und den Rezeptoren, an die sie binden:

- **Typ I Zytokine** (In Tertiärstruktur vier gebündelte α -Helices. Jak-STAT oder Ras-Raf-MAP-Kinase Signalweg).
- **Typ II Zytokine** (In Tertiärstruktur sechs nicht gebündelte α -Helices. Jak-STAT Signalweg).
 - **Typ I Interferone** (mit den Untergruppen IFN α , IFN β und IFN ω).
 - **Typ II Interferone** (IFN γ).
- **Chemokine** (Chemotaktisch wirkende Zytokine; Einordnung anhand von Cystein in ihrer Aminosäuresequenz in vier Unterfamilien).
- **TNF Familie** (Trimer-Bildung. Strukturell unterschiedlich zu anderen Zytokinen).

Binden Zytokine in der Peripherie oder im Gehirn an ihre Rezeptoren, so führt dies zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT3 (aktiviert durch IL-6) oder NF- κ B (aktiviert durch IL-1), welche für proinflammatorische Zielgene kodieren. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Zytokine genauer betrachtet.

TUMOR-NEKROSE-FAKTOR α (TNF α)

Bei TNF α handelt es sich um ein Zytokin, welches neben seinen inflammatorischen Effekten auch zu einer hämorrhagischen Nekrose von Hautsarkomen bei Mäusen führt, was die Namensgebung erklärt (Carswell et al., 1975). Eine Reihe von Zellen (Mononukleäre Phagozyten, Mastzellen, aktivierte T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen), sind in der Lage, TNF α zu produzieren und abzugeben. Es wird als membrangebundenes Pro-Peptid synthetisiert, durch TACE (tumor necrosis factor alpha converting enzyme, eine Metalloprotease in der Zellmembran), gespalten und so in seine aktive Form überführt. TACE schwächt gleichzeitig, durch Freisetzung von TNF-bp (TNF-binding-protein), die TNF α Wirkung ab. (Bemelmans et al., 1996; Roth et al., 1998).

Die intravenöse Injektion von TNF α führt zur Entwicklung von Fieber und induziert die IL-1 Synthese (Dinarello, 2004). Entfernt man TNF α durch passive Immunisierung, kommt es zu einer Verringerung der zirkulierenden IL-1 β und IL-6 Konzentrationen und im weiteren zu einer Reduktion der Fieberantwort (Cooper et al., 1994; Roth et al., 1998).

TNF α ist, neben IL-1 β und IL-6, einer der ersten Mediatoren, welcher in der frühen Entzündungsphase nach Stimulation mit LPS, MDP (Muramyldipeptid) oder durch synthetische doppelsträngige RNA, wie Poly I:C, induziert wird und im Blutplasma nachzuweisen ist (Andersson et al., 1992; Kluger, 1991; Roth et al., 1997; Voss et al., 2006). Insofern lag es auf der Hand, auch im Rahmen der hier vorliegenden Studie die TNF α Konzentration in

Plasma- und Lavageproben nach Stimulation mit den TLR 7 und 9 Agonisten quantitativ zu bestimmen.

INTERLEUKIN-1 β (IL-1 β)

IL-1 ist ein 17 kDa schweres Peptid, von dem zwei Formen α und β existieren (Rothwell, 1991). IL-1 β auf das hier näher eingegangen wird, weil es für Entzündungsreaktionen wichtiger ist, bindet an zwei verschiedene Rezeptortypen, von denen aber nur der aus zwei Untereinheiten bestehende Typ 1 (IL-1RI) Rezeptor zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Typ 2 (IL-1RII) bindet IL-1 β zwar mit hoher Affinität, löst aber keine Signalkaskade im Zellinneren aus (Mantovani et al., 2001).

Nach der Injektion von IL-1 β entwickeln Nager, Kaninchen und Menschen Fieber und bilden IL-6. Die Vorbehandlung mit IL-1ra (human recombinant interleukin-1 receptor antagonist) reduziert deutlich das durch LPS oder andere exogene Pyrogene ausgelöste Fieber und vermindert in Hypothalamus und Hippokampus die IL-1, TNF und IL-6 Freisetzung (Fortier et al., 2004; Layé et al., 2000; Roth & De Souza, 2001). Diese Tatsachen belegen deutlich, dass IL-1 β als endogenes Pyrogen fungiert. Allerdings kann es nicht allein für die Entwicklung von Fieber verantwortlich sein, da IL-1-KO-Mäuse nach LPS Injektion, zwar eine abgeschwächte, aber dennoch eine Fieberantwort zeigen (Kozak et al., 1995).

IL-1 führt über die Aktivierung der COX zur Bildung von PGE₂, steigert die Expression von EP3-Rezeptoren, welche PGE₂ binden, und ist so an der Regulation der Prostaglandin Wirkung beteiligt (siehe Kap. 1.3.2) (Ushikubi et al., 1998). Des Weiteren beeinflusst es Bildung und Freisetzung pyretisch (IL-6) und antipyretisch (IL-10) wirkender Zytokine aus Makrophagen, Endothel- und Mikroglia Zellen (Foey et al., 1998; Luheshi et al., 1996). Es löst Anorexie, Gewichtsverlust und eingeschränkte Aktivität aus und stimuliert Neurone, welche CRF (Corticotropin releasing factor) freisetzen und so via ACTH- und Cortisol-Ausschüttung die inflammatorischen Prozesse bremsen (Berkenbosch et al., 1987; Sapolsky et al., 1987).

INTERLEUKIN-6 (IL-6)

IL-6 ist ein lösliches Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 26 kDa, das ursprünglich BSF-2 (B-Zell stimulierender Faktor-2) genannt wurde (Bazan, 1990; Poupart et al., 1987). Bald zeigte sich jedoch, dass IL-6 Einfluss auf eine Reihe weiterer Zellen (T-Zellen, Keratinozyten, Hepatozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoklasten sowie Zellen des

haematopoetischen Systems) ausübt und unter anderem im ZNS von Gliazellen und Neuronen gebildet wird (Frei et al., 1989; Maimone et al., 1993).

IL-6 ist ein wichtiges endogenes Pyrogen. Sein Anstieg im Blutplasma korreliert mit dem Anstieg der Körpertemperatur während des Fiebers. Während einer Fieberantwort können erhöhte IL-6 Werte nicht nur im Plasma, sondern auch in der CSF gemessen werden (Cocciani et al., 1993; Ueno et al., 1989). Interessanterweise führt eine periphere Injektion von hoch dosiertem IL-6 alleine nicht unter allen experimentellen Bedingungen zu einer Erhöhung der Körpertemperatur (Luheshi et al., 1996), obwohl ein solcher Temperaturanstieg in moderatem Umfang dann beobachtet wird, wenn Spezies spezifisches IL-6 eingesetzt wird (Harré et al., 2002). Durch eine Vorbehandlung mit IL-6 Antiserum kann jedoch die Fieberantwort nach LPS Injektion unterbunden werden (Cartmell et al., 2000).

Der aus zwei Untereinheiten bestehende IL-6 Rezeptor bindet das Zytokin mit seiner α -Kette, bildet zusammen mit gp130 einen Komplex und initiiert so die Signalkaskade ins Zellinnere (Kishimoto et al., 1992; Taga, 1992). Durch gp130 werden drei Mitglieder (JAK1, JAK2, TYK2) der Janus Kinase Familie aktiviert und es kommt zur Phosphorylierung der tyrosinhaltigen Region des zytoplasmatischen Anteils von gp130. Es folgt die Rekrutierung und Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3, welche Dimere bilden, in den Zellkern wandern und dort ihre Zielgene aktivieren (siehe Kap. 1.4.1).

INTERFERONE (IFN)

1935 wurde erstmals beobachtet, dass Affen die artifiziell mit avirulenten Gelbfieberviren infiziert wurden, für die nächsten 24 Stunden gegenüber einer Infektion mit dem Wildtyp nicht empfänglich waren (Findlay & MacCallum, 1937). Die Ursache dieser Beobachtung, die als Virusinterferenz beschrieben wurde, blieb zunächst ungeklärt. 1957 wurde beobachtet, dass mit inaktiviertem Influenzavirus infizierte Hühnerembryonen lösliche Faktoren bildeten, die in der Lage waren eine Infektion durch Influenzavirus in anderen Hühnerembryonen zu verhindern (Isaacs & Lindenmann, 1987). Aufgrund der Fähigkeit mit der viralen Replikation zu interferieren wurden diese Faktoren als Interferone bezeichnet.

Heute versteht man unter Interferonen speziesspezifische Proteine, die von vielen verschiedenen Zelltypen im Rahmen der Immunantwort auf virale Infektionen sowie unter Einfluss zahlreicher antigener oder mitogener Stimuli gebildet werden (Pschyrembel, 2004).

Man unterscheidet drei IFN Typen (I, II, III), von welchen der letzte erst vor wenigen Jahren erstmals beschrieben wurde (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Zu den Typ I IFN, die innerhalb weniger Stunden nach Infektion gebildet werden, zählen

IFN α (hauptsächlich aus B- und T-Zellen) und IFN β (hauptsächlich aus Fibroblasten und epithelialen Zellen) sowie die weniger gut beschriebenen IFN κ und IFN ω (Guidotti & Chisari, 2000; Pestka et al., 2004).

Die Signaltransduktion von IFN α und IFN β erfolgt über einen ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen exprimierten Rezeptor, welcher sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt. Nach Rezeptordimerisierung und Autophosphorylierung kommt es zur Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs (Platanias, 2005; Schindler, 1995).

Typ II Interferon (IFN γ), welches säurelabil ist und durch Hitze inaktiviert wird, wird hauptsächlich von T-Zellen und natürlichen Killerzellen gebildet, weist keine Sequenzhomologien zu den Typ I Interferonen auf und liegt in seiner aktiven Form als Dimer vor. Die Signaltransduktion erfolgt über einen eigenen Rezeptor, der nicht in Zusammenhang mit dem Typ I Rezeptor steht (Pace et al., 1985; Platanias, 2005).

2003 wurden erstmals Typ III Interferone (IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3) beschrieben (Kotenko et al., 2003). Diese verfügen ebenso wie die anderen Interferone über antivirale Eigenschaften und werden wahrscheinlich hauptsächlich von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) produziert (Coccia et al., 2004).

Interferone besitzen antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkung. Nachdem sie an ihre jeweiligen Rezeptoren auf der Zielzelle gebunden haben, kommt es zur Genaktivierung und Induktion spezifischer Proteine, wobei IFN α und IFN β hauptsächlich antiviral (etwa Zehn bis Hundert mal stärker als IFN γ) (Schreiber & Farrar, 1993) und IFN γ eher immunmodulatorisch, durch Induktion von Zytokinen und Aktivierung von Makrophagen, Lymphozyten (T und B) und natürlichen Killerzellen, wirken (Nathan, 1987).

Die klinische Bedeutung der IFN ist durch eine Reihe von Studien belegt. Eine Deletion des IFN α Gens bei der Maus erhöht die Anfälligkeit für virale Infektionen deutlich (Dupuis et al., 2003). Durch Applikation von Antisera gegen IFN α oder IFN β konnte die Resistenz gegen Herpesvirusinfektionen aufgehoben werden (Kunder et al., 1993). IFN γ wurde bei einer Vielzahl von Erkrankungen, wie z.B. Tuberkulose oder zystischer Fibrose, Hepatitis oder verschiedenen Krebsarten mit unterschiedlichem Erfolg erprobt (Miller et al., 2009).

Was die Rolle von Interferonen bei der Fieberentstehung betrifft, gibt es kein einheitliches Bild. IFN γ hat, durch seine Fähigkeit unter bestimmten Bedingungen, Endotoxin-tolerante Makrophagen zur Bildung von TNF und IL-6 anregen zu können, proinflammatorische Eigenschaften (Chen & Ivashkiv, 2010). Neben dieser indirekten Wirkung wurde auch die unmittelbare Kapazität von intravenösen oder intrazerebroventrikulären Injektionen von IFN γ zur Induktion einer Fieberantwort bei Kaninchen beschrieben (Morimoto et al., 1987). Dagegen scheint IFN α eher als ein endogener antipyretischer Faktor zu wirken. In einer

neueren Studie konnte gezeigt werden, dass intranasale Behandlung von Frettchen mit IFN α zur Unterdrückung der im Rahmen einer Influenza Infektion auftretenden Fieberreaktion führt (Kugel et al., 2009).

1.3.2 PROSTAGLANDINE

Die physiologisch in fast allen Organen vorkommenden Prostaglandine sind Derivate der Prostansäure und weisen strukturelle Ähnlichkeit mit Leukotrienen und Thromboxanen auf. Synthetisiert werden sie hauptsächlich aus Arachidonsäure, die durch Phospholipase A₂ aus Membranlipiden frei- und durch COX zu PGH₂ umgesetzt wird. Dieses ist der Vorläufer aller natürlich vorkommenden Prostaglandine und Thromboxane. PGH₂ wird durch PGES (Prostaglandin E Synthase) zu PGE₂, welches eine Schlüsselrolle bei der Fieberinduktion besitzt, verstoffwechselt.

Die Wirkungen der Prostaglandine allgemein sind vielfältig und zum Teil gegensätzlich. Sie spielen eine Rolle bei der Entstehung von Fieber, Schmerzen und Entzündungen und sind durch NSAID (non-steroidal-anti-inflammatory-drugs) hemm- oder abschwächbar. Durch Applikation eines COX-Hemmers unterdrückt man die Fieberentwicklung nach LPS Stimulation (Roth et al., 2002; Roth et al., 2009) wobei die induzierbare Form COX 2 das entscheidende Isoenzym ist (Cao et al, 1997; Li et al., 1999). Die Konzentration an biologisch aktivem PGE₂ steigt während Fieber in Blut und Gehirn (Preaoptische Region / Anterior Hypothalamus) stark an (Milton, 1998). Schaltet man PGES aus, welches PGH₂ zu PGE₂ umsetzt, entwickeln Mäuse nach LPS Stimulationen kein Fieber. Auch für dieses Enzym ist die inflammatorische induzierbare Form, die mikrosomale PGES für die Ausbildung einer Fieberreaktion entscheidend (Engblom et al., 2003). In der Peripherie gebildetes PGE₂ spielt bei der Signalübertragung durch afferente Nervenfasern eine Rolle, wie Versuche zeigen, bei denen diese durch das Lokalanästhetikum Ropivacain oder den unspezifischen COX-Hemmer Diclofenac ausgeschaltet wurden (Ross et al., 2000; Ross et al., 2003). Weiterhin ist PGE₂ während der frühen Entzündungsphase an der Extravasation, Migration und Aktivierung von Leukozyten beteiligt.

1.4 POTENTIELLE MEDIATOREN ZENTRALNERVÖS KONTROLLIERTER KRANKHEITSSYMPTOME IM GEHIRN

1.4.1 AKTIVIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Bei Entzündungsreaktionen, die durch Zytokine oder PAMPs ausgelöst werden, spielen die Transkriptionsfaktoren NF- κ B („nuclear factor kappa B“), STAT3 („signal transducer and activator of transkription“) und NF-IL6 („nuclear factor IL-6“) eine wichtige Rolle (Akira, 1997; Damm et al., 2011; Nadjar et al., 2003). Sie regulieren zentral die Bildung von Zytokinen und Prostaglandinen und leiten so die Entstehung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome ein (Kano et al., 2003; Kozak et al., 2006; Nadjar et al., 2005; Rummel et al., 2006). Interaktionen zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren („cross talk“) können synergistische oder antagonistische Effekte bewirken und zur Expression von Genen führen, für die der einzelne Transkriptionsfaktor keine Bindungsstelle im Promotor besitzt (Agrawal et al., 2003).

Bemerkenswert ist die hohe Geschwindigkeit, mit der der Organismus in der Lage ist, inflammatorische Mediatoren nach Stimulation zu produzieren. Entscheidend dafür ist, dass Transkriptionsfaktoren bereits im Zytoplasma vorliegen und nicht erst die zeit- und energieaufwändige Proteinbiosynthese begonnen werden muss, wenn der entsprechende Stimulus eingeht (posttranslationale Kontrolle). Nach Aktivierung wandern Transkriptionsfaktoren in den Zellkern, wo sie an ihre Zielgene binden, so dass die Transkription dieser innerhalb von Minuten beginnt (Levy et al., 1988; Schindler et al., 1992).

NUCLEAR FACTOR- κ B (NF- κ B)

Eine prominente Rolle bei der Fieberentstehung und der Vermittlung von Entzündungsreaktionen wird dem 1986 entdeckten NF- κ B zugesprochen. Zur NF- κ B Proteingruppe gehören eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren (p50, p52, p60, Rel und RelB).

In den meisten Zellen wird NF- κ B durch die inhibitorischen Proteine I κ B (Inhibitors of κ B) im Zytoplasma im inaktiven Zustand gehalten (Baeuerle & Baltimore, 1988). Bindet nun zum Beispiel ein PAMP an einen TLR kommt es zu einer Signalkaskade (siehe Kap. 1.1.3), an deren Ende NF- κ B freigesetzt wird und als Homo- oder Heterodimer in den Zellkern wandert. Dort beeinflusst es die Genexpression mittels Bindung an spezifische Promotoren (Ghosh & Karin, 2002). Die Expression einiger an der Immunantwort beteiligter Gene (TNF α , IL-6, IL-12, IL-1 β) wird erhöht (Kielian, 2006). Ebenso induziert NF- κ B aber auch die vermehrte Expression des I κ B-Gens und bereitet so über eine negative

Feedback Schleife seine eigene Abschaltung vor. Des weiteren ist NF- κ B an vielen grundlegenden zellulären Prozessen, wie der Kontrolle von Wachstum, Differenzierung oder Apoptose beteiligt.

SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSKRIPTION 3 (STAT3)

Bislang wurden sieben verschiedene STAT Moleküle beschrieben (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6). STAT3, das 1994 erstmals als wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Induktion der Akuten-Phase-Reaktion in Leberzellen beschrieben wurde, kommt in einer Vielzahl von Zelltypen vor (Akira et al., 1994; Bhattacharya & Schindler, 2003; Zhong et al., 1994) und existiert in mehreren Isoformen, welche sich in der Länge des COOH-Endes unterscheiden. STAT3 ist während der Evolution in hohem Maß konserviert und der Unterschied zwischen humanem und murinem STAT3 liegt bei nur einer Aminosäure (Pietra et al., 1998). Die hohe Persistenz des Moleküls deutet auf eine essenzielle Rolle im Organismus hin. Zu dieser Überlegung passt auch, dass STAT3 das einzige Mitglied der STAT Familie ist, dessen „knockout“ Mäuse nicht lebensfähig sind (Takeda et al., 1997).

Zytokine wie IL-6, IL-10 oder IFN beeinflussen über STAT3 die Genexpression in verschiedensten Zelltypen (Kisseleva et al., 2002). Bei Versuchen mit IL-6 defizienten Mäusen wurde festgestellt, dass STAT3 bei einer lokalen Entzündung als Transkriptionsfaktor nicht vorhanden war (Alonzi et al., 1998). In nicht aktivierten Zellen findet man STAT3 Moleküle hauptsächlich im Zytoplasma. Bei Rezeptoraktivierung, wird STAT3 phosphoryliert (hauptsächlich JAK1 vermittelt), bildet Homo- oder Heterodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren und akkumuliert über eine schnelle Translokation im Kern (Caldenhoven et al., 1999; Heinrich et al., 1998). Dort lagert es sich mit seiner DNA-Bindungsdomäne an die entsprechenden DNA Abschnitte („responsive-elements“) der Zielgene an.

Bei den durch STAT3 aktivierten Genen handelt sich um Akute Phase Proteine (z.B. C-reaktives Protein), andere Transkriptionsfaktoren und zum Teil noch unbekannte Gene, sowie für die Prostaglandinsynthese wichtige Enzyme. SOCS3 (supressor of cytokine signaling 3), ein endogener Inhibitor des JAK-STAT3-Signalweges, wird ebenfalls als Indikator der STAT3 Aktivität verwendet (Rummel et al., 2008)

NUCLEAR FACTOR INTERLEUKIN 6 (NF-IL6)

NF-IL6 ist ein wichtiger inflammatorischer Transkriptionsfaktor (Akira, 1997; Ramji & Foka, 2002). Die kürzeste der drei Isoformen wirkt inhibitorisch. Im Gegensatz zu STAT3 wird NF-IL6 im Kern durch die Ras-Raf-MEK-MAPK-Kinase-Kaskade aktiviert (Poli, 1998). Wie

durch STAT3 werden auch durch NF-IL6 wichtige Zielgene für Entzündungsreaktionen aktiviert. Zu diesen gehören unter anderem das Gen für COX 2, IL-1, IL-6 und verschiedene Chemokine. Weiterhin wird dem Transkriptionsfaktor eine Funktion bei Zellproliferation und Differenzierung, dem Metabolismus und der Bildung des Langzeitgedächtnis im Hippocampus zugeschrieben (Ramji & Foka, 2002).

1.4.2 ZYTOKINBILDUNG IM GEHIRN

Zytokine, die eine Schlüsselposition bei der Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome einnehmen, können auf humoralem Weg (mit dem Blutstrom) aus der Peripherie an die CVOs gelangen, oder am Ort der Entzündung gebildet, sensorisch afferente Nervenfasern stimulieren, die Aktionspotenziale zum Gehirn weiterleiten und dort die Induktion von Zytokinen bewirken (Roth & De Souza, 2001). Auf beide Wege wurde in Kap. „1.2 Signalewege zur Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome“ bereits näher eingegangen.

Eine dritte Möglichkeit ist die direkte Stimulation von Zellen der sCVO durch exogene Pyrogene (Roth et al., 2004). Nach intravenöser Gabe einer moderaten LPS Dosis zeigten Kaninchen im Bereich des OVLT eine lokal begrenzte Akkumulation von IL-1 β (Nakamori et al., 1994). Ebenso konnte die Bildung von TNF α in OVLT und AP von Mäusen nachgewiesen werden (Breder et al., 1994). Zellkulturstudien haben erwiesen, dass Zellen von OVLT und AP direkt auf Stimulation mit LPS reagieren (Ott et al., 2010; Wuchert et al., 2008).

Einige TLRs, über die viele exogene Pyrogene zur Induktion von Zytokinen führen, werden im Bereich der sCVO konstitutiv exprimiert (Laflamme & Rivest, 2001). LPS ist weiterhin in der Lage, die Expression einiger TLRs im Bereich der CVO zu erhöhen (Rivest et al., 2000). Als Folge einer Aktivierung der CVOs über TLR Agonisten oder über zirkulierende Zytokine, greift eine induzierbare Zytokinexpression bis in weite Bereiche des Hypothalamus aus (Layé et al., 2000). Es gibt Evidenz dafür, dass die im Bereich des Hypothalamus gebildeten Zytokine TNF, IL-1 und IL-6 an der Entstehung von Fieber und Anorexie beteiligt sind (Chai et al., 1996; Harden et al., 2011; Palin et al., 2007; Soares et al., 2011).

1.4.3 INDUZIERBARE ENZYME DER PROSTAGLANDINSYNTHESE

Bereits im „Prostaglandin-Kapitel“ (Kap. 1.3.2) wurde die Umsetzung von Arachidonsäure zu PGH₂ durch COX und der folgende Schritt enzymatischer Umsetzung von PGH₂ zu PGE₂ durch PGES beschrieben. Von beiden katalysierenden Enzymen gibt es mehrere

Isoformen, wobei COX 2 und mPGES-1 durch inflammatorische Reize induzierbar sind. Sie werden unter anderem durch die oben beschriebene Transkriptionsfaktoren reguliert, welche ihrerseits durch Zytokine aktiviert werden.

Während einer entzündlichen Reaktion zeigt sich eine vermehrte COX 2 und mPGES Expression im Gehirn. Beide Enzyme gelten als essenziell für die Bildung von PGE₂ (Matsumura & Kobayashi, 2004; Turrin & Rivest, 2004; Yamagata et al., 2001). Die COX 2 Expression ist unter inflammatorischen Bedingungen besonders deutlich in Endothel- und Perivaskulären Zellen des Gehirns zu beobachten (Matsumura & Kobayashi, 2004; Schiltz & Sawchenko, 2003).

COX 2 bzw. mPGES-1 knockout Mäuse zeigen nach Stimulation mit LPS eine abgeschwächte Fieberantwort, was die wichtige Rolle beider Enzyme bei der Entstehung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome deutlich macht (Engblom et al., 2003; Li et al., 1999). In der Peripherie durch COX 2 und mPGES synthetisierte Prostaglandine treten unter inflammatorischen Bedingungen verstärkt ins Parenchym des ZNS über (Davidson et al., 2001; Steiner et al., 2006). EP3-Rezeptoren, welche PGE₂ binden, wurden an thermosensorischen Neuronen nachgewiesen. PGE₂ führt in der ventromedialen präoptischen Region zu einer Herabsetzung der Impulsrate warmsensitiver Neurone (Matsumura et al., 1992; Nakamura et al., 2000; Ranelis & Griffin, 2003; Sugimoto et al., 1994). Diese projizieren in nachgeschaltete Temperaturregulationszentren und führen dort zu einer Sollwertverstellung der Körpertemperatur, was zur gesteigerten Wärmeproduktion und Fieberentwicklung führt (Hori et al., 1988; Nakamura et al., 2004; Xin & Blatteis, 1992).

1.5 ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN

Agonisten der endosomal lokalisierten TLRs 7 und 9 wurden bis dato noch nicht auf ihre Fähigkeit hin untersucht, systemische und lokale Entzündungsreaktionen unter begleitender Entstehung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome induzieren zu können. Wegen des vielfältigen therapeutischen Potentials solcher Substanzen, sind solche Studien jedoch von essenzieller Bedeutung. Die zentralen Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit lassen sich daher wie folgt zusammenfassen.

1. Führen systemische (IP) oder lokale (SC) Stimulationen mit spezifischen Agonisten der endosomal TLRs 7 und 9 zur Ausbildung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome?

2. Wenn ja, welche potentiellen Mediatoren und Mechanismen sind hierfür a) in der Körperperipherie als potentielle Signalüberträger zum Gehirn und b) im Gehirn selbst dafür verantwortlich?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden unter Verwendung etablierter Experimentalmodelle lokalisierter und systemischer Inflammation unspezifische Krankheitssymptome mittels moderner Telemetriesysteme quantitativ analysiert. Ferner wurden Expression und Bildung potentieller inflammatorischer Signalmoleküle (IFN, TNF, IL-6) in der Körperperipherie untersucht. Schließlich wurde die inflammatorische Aktivierung des Gehirns unter dem Einfluss der TLR 7 und 9 Agonisten durch quantitative Erfassung einer breiten Palette an inflammatorischen Signalmolekülen (Transkriptionsfaktoren, Interferone, Zytokine, induzierbare Enzyme der PG-Synthese) molekular charakterisiert.

Die erzielten Befunde wurden im Kontext zu den Erkenntnissen, die für andere TLR Agonisten (besonders für LPS) bereits vorliegen, vergleichend betrachtet und im Bezug auf die potentielle therapeutische Einsetzbarkeit von Agonisten der endosomalen TLRs diskutiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die unter Kap. 2.1 aufgelisteten Geräte und Materialien wurden für verschiedene Methoden verwendet und wurden deshalb am Anfang des Material und Methoden Teils zusammengestellt, da sie sonst im Laufe der Arbeit mehrfach genannt würden. Geräte und Materialien, die nur für eine Methode Anwendung fanden, sind unmittelbar vor dem jeweiligen Kapitel aufgelistet.

2.1 GERÄTE- UND MATERIALLISTE I

Adobe Photoshop CS4, Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim – DE

Aqua ad injectionem, Braun, Melsungen – DE

Deckgläschen, 24 x 60 mm, Stärke 1, Menzel GmbH, Braunschweig – DE

Einmalkanüle, Sterican 0,6x 30 mm 23 G, Braun, Melsungen – DE

Einmalspritze, BD Plastipak 60 ml, Becton- Dickinson, Heidelberg – DE

Graph Pad Prism®, Version 4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA – US

Kryostat Typ HM 500, Fa. Microm GmbH, Walldorf – DE

Mikrozentrifuge, Force 7, Roth Laborbedarf, Karlsruhe – DE

Objektträger 26 x 76 mm, Menzel GmbH, Braunschweig – DE

OpenOffice 3.3.0, Sun Microsystems, Santa Clara, CA – US

Parafilm, Roth Laborbedarf, Karlsruhe – DE

Pipetten, 1000, 500, 200, 100, 100-1000, 10-100, 2-10, 0,5-2 µl,
Eppendorf AG, Hamburg – DE

Pipettenspitzen, 1000, 500, 200, 100, 100-1000, 10-100, 2-10, 0,5-2 µl,
Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster – AT

Poly-L-Lysin, Poly-L-Lysin Solution P8920, Sigma, St. Louis – US

Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 und 5 ml Eppendorf AG, Hamburg – DE

Reinstwassersystem Milli-Q Biocel, Millipore, Eschborn – DE

Röhrchen, steril, 15 ml, Sarstedt, Nümbrecht – DE

Serologische Pipetten 1, 5, 10 und 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht – DE

StatView®, Abacus Concepts, Berkeley, CA – US

Tissue Freezing Medium®, Leica Instruments GmbH, Nussloch – DE

Trockeneis, Balser, Lich - DE

Waagen zum Abwiegen von Trockensubstanzen, P1210N; AE 50 und PM 2500,
Mettler Toledo, Giessen – DE

Zentrifuge MicroV, Fisher Scientific, Schwerte – DE

2.2 IN VIVO VERSUCHE

2.2.1 GERÄTE- UND MATERIALLISTE II

Acepromazin, Vetranquil 1%, Albrecht GmbH, Aulendorf – DE

DIETDAT, Version 1.70, AccuScan Instruments, Columbus, OH – US

Einstreu für Tierkäfige, Altromin animal bedding Altromin GmbH und Co KG, Lage-Lippe – DE

Empfängerplatte, ER-4000 Receiver, Fa. Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR – US

Imiquimod – R837, InvivoGen, San Diego, CA – US

Instrumenten-Desinfektionsmittel Konsolex® AF, Bode Chemie, Hamburg – DE

Isotone NaCl- Lösung, 0,9% Braun, Melsungen – DE

Ketaminhydrochlorid, Ketamin® 10%, ESSEX Pharma GmbH, München – DE

Meloxicam (Metacam® Suspension zum Eingeben, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim/Rhein – DE

Nahtmaterial, nicht resorbierbar, Dermafil, USP 2/0, EP 3, SMI AG, Hünningen – BE

Nahtmaterial, resorbierbar, Surgicryl, USP 3/0, EP 2, SMI AG, Hünningen – BE

ODN 1668, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin – DE

Operationsbesteck, Aesculap AG & CoKG, Tuttlingen – DE

Polycarbonat-Käfige, Typ III, 28 x 42 x 15 cm / B x T x H, FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, Emmerdingen – DE

Polycarbonat-Käfige, Typ IV, 38 x 59 x 18 cm / B x T x H, FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, Emmerdingen – DE

Polyvidon-Iod, Braunol®, Braun, Melsungen – DE

spezielle Messkäfige, 30 x 22,5 x 24 cm; L x H x B, Institutseigene Werkstatt

Sterilfilter, Porengrösse 0,7 µm, Schleicher & Schuell – Dassel DE

Tierfutter, Zucht-Diätfutter, Altromin GmbH und Co KG, Lage-Lippe – DE

Transmitter, PDT-400 E-Mitter, Fa. Mini-Mitter Company Inc., Sunriver. OR – US

Vidisic®-Augengel, Carbomer 40000-60000, Bausch & Lomb, Berlin – DE

Vital View, Fa. Mini-Mitter Company Inc., Sunriver, OR – US

Waage zum Wiegen der Tiere, Sartorius Universal Sartorius AG, Göttingen – DE

Wärmematte, für Kleintiere Henry Schein Vet GmbH, Hamburg – DE

Xylazinhydrochlorid, Xylazin 2%, cp-pharma GmbH, Burgdorf – DE

2.2.2 VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN

Für alle Versuche wurden männliche Wistar-Ratten (*Rattus spec.*), mit einem Körpergewicht von 180 ± 20 g verwendet, die aus der institutseigenen Zucht stammten. Die Elterntiere wurden von Charles River WIGA (Sulzfeld) bezogen.

Gehalten und aufgezogen wurden die Tiere bei einer konstanten Raumtemperatur von $23 \pm 1^\circ \text{C}$, einer relativen Luftfeuchte von 50% und einem 12/12 Stunden hell/dunkel Rhythmus (Beginn der Nachtphase: 19:00 h).

Bis zum Absetzgewicht von 110 ± 10 g Körpermasse wurden Jung- und Muttertiere zusammen in Typ IV Käfigen gehalten. Danach erfolgte die Haltung der Jungtiere bis zum Versuchsbeginn nach Geschlechtern getrennt in Gruppen nicht grösser als fünf in Typ III Käfigen.

Futter und Wasser (in Trinkwasserqualität) standen während der gesamten Zeit *ad libitum* zur Verfügung. Als Einstreu diente Altromin Animal-Bedding.

Die Tierversuche wurden der lokalen Tierschutzkommission, vor Aufnahme des Projekts, gemeldet und mit der Projektnummer GI 18/2-Nr.43/2009 genehmigt.

2.2.3 OPERATION UND OPERATIONSVORBEREITUNG

2.2.3.1 NARKOSE UND PRÄMEDIKATION

12 bis 18 Stunden vor der Operation wurde Meloxicam (2 mg/kg SC) appliziert. Eine weitere Injektion gleicher Dosierung erfolgte unmittelbar vor Operationsbeginn. Die Injektionsnarkose (5 mg/kg Xylazin, 50 mg/kg Ketamin, 0,5 mg/kg Acepromazin) erfolgte als Mischspritze in das subkutane Bindegewebe der Thoraxwand.

Um Narkosetiefe und Schmerzfreiheit des Tieres zu überprüfen wurden Lidreflex am Auge und Flexorreflex an der Zwischenzehenhaut der Pfoten getestet. Bei zufriedenstellender Narkosetiefe waren beide Reflexe nicht auslösbar. Um das Austrocknen der *Corneae* zu verhindern wurde in beide Lidspalten Vidisic®-Augengel eingebracht.

2.2.3.2 IMPLANTATION DES RADIOTRANSMITTERS

Das Tier wurde in Rückenlage auf eine Wärmematte verbracht um ein Auskühlen während des Eingriffs zu vermeiden. In einem Bereich von vier Zentimetern um den Nabel wurden die Haare geschoren und die Haut dreimal mit Cutasept®-Lösung desinfiziert.

Der Zugang zur Bauchhöhle erfolgte über die *Linea alba*. In der Medianen kaudal des Nabels wurde mit dem Skalpell ein zwei Zentimeter langer Hautschnitt gelegt und nach Präparation des Unterhautgewebes die *Mm. abdominales* dargestellt. Es folgte eine Stichinzi-

sion in die Muskulatur und eine vorsichtige Erweiterung der Wundränder entlang der *Linea alba* mit Hilfe einer Schere nach Metzenbaum.

Der desinfizierte Radiotransmitter wurde in die Bauchhöhle eingebracht und danach die Wunde in zwei Schichten verschlossen (Muskulatur: resorbierbares Nahtmaterial, fortlaufende Naht; Haut: nicht-resorbierbares Nahtmaterial, Einzelhefte).

2.2.3.3 DER RADIOTRANSMITTER

Das Prinzip der Datenerfassung (Körpertemperatur und lokomotorische Aktivität) beruht auf einem telemetrischen Sender (Transmitter) und einer Empfängerplatte unter dem Tierkäfig, welche an einen Computer angeschlossen war, der mittels speziellem Datenerfassungssystem (Vital View®) die Daten im Fünf Minuten Takt aufnahm.

Der Sender war projektilförmig, wog sieben Gramm und besaß einen Silikonüberzug, um Fremdkörperreaktionen zu vermeiden (Abb. 4). Er wurde dem Tier eine Woche vor Versuchsbeginn intraabdominal implantiert, sodass eine unterbrechungslose, stressfreie Aufzeichnung der Parameter möglich war.

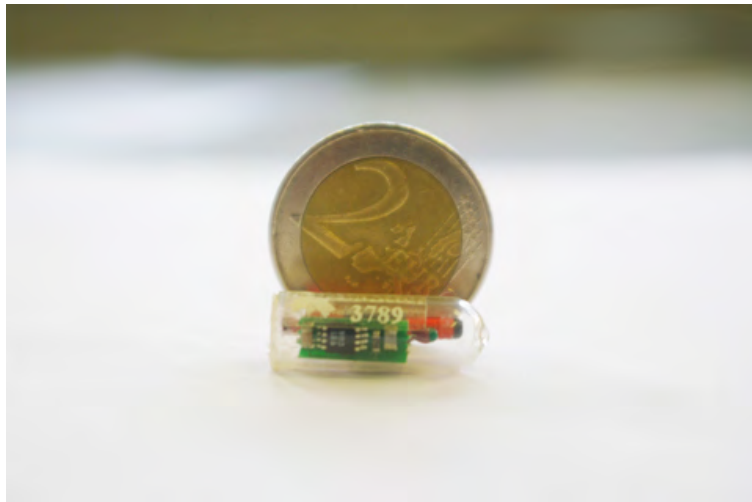


Abb. 4: Foto des Radiotransmitters zur Aufzeichnung von Körpertemperatur und Bewegungsaktivität im Grössenvergleich zu einer zwei Euro Münze.

Erfasst wurde die Temperatur durch einen wärmeempfindlichen Transistor mit negativem Temperaturkoeffizienten (NTC), welcher proportional zur Temperaturänderung sein Radiofrequenzsignal (Hz) verändert. Temperaturerhöhung führte zu steigenden, Temperaturverringerung zu sinkenden Impulsraten.

Der Transmitter diente gleichzeitig der Messung der Bewegungsaktivität, mittels eines eingebauten Trägheitselements. Das von diesem generierte Signal variiert in der Stärke ab-

hängig von seiner Entfernung und Ausrichtung zum Empfänger. Bewegungsänderungen des Tieres konnten somit als Signaländerungen von der Empfängerplatte unter dem Käfig registriert werden. Die Stärke der Signale korrelierte mit der lokomotorischen Aktivität des Tieres und wurde als "activity counts" in einem festgelegten Zeitintervall (5 min.) erfasst. Induktion an einer Kupferspirale versorgte den Sender mit Energie, was Batterien überflüssig machte (Harkin et al., 2002).

Drei Tage vor Versuchsbeginn wurde Vital View® gestartet, um die ordnungsgemäße Funktion der Sender zu überprüfen.

2.2.3.4 ERZEUGEN EINER SUBKUTANEN LUFTBLASE („AIRPOUCH“)

Zum Anlegen des airpouches im Anschluss an die Implantation des Radiotransmitters wurden eine Spritze mit aufgestecktem Sterilfilter und eine Einmalkanüle verwendet. Die Tiere wurden in Bauchlage verbracht und mit der Kanüle die Haut zwei Zentimeter caudal der *scapula* in der Medianen durchstoßen und die Kanüle im subkutanen Bindegewebe nach *cranial* geschoben, bis die Spitze zwischen den Schulterblättern lag. Um einen airpouch von ca. 3x 4x 2 cm zu bilden, mussten etwa 20 ml steril filtrierte Luft injiziert werden.

2.2.3.5 NACHSORGE

Nach der Operation wurde das Tier in seinen Käfig zurück verbracht, welcher von unten mit einer Wärmematte beheizt wurde, bis die Ratte das Bewusstsein vollständig zurück erlangte. Eine weitere Injektion Meloxicam (2 mg/kg SC) erfolgte 24 Stunden *post operationem*. An den Folgetagen wurde die Wunde täglich inspiziert, sowie das Allgemeinbefinden der Tiere anhand des Körpergewichts, des Verhaltens und der Futter-/Wasseraufnahme beurteilt.

2.2.4 VERWENDETE SUBSTANZEN (TLR AGONISTEN)

2.2.4.1 IMIQUIMOD – R837

Imiquimod ist ein synthetisches Guanosinanalogue (Abb. 5) aus der Familie der Imidazoquinoline, welches an TLR 7 bindet. Das Molekül besitzt immunmodulatorische Eigenschaften und indirekte antivirale Wirkung, die zuerst an mit Herpes Simplex Virus infizierten Meerschweinchen gezeigt werden konnte (Harrison et al., 2001). Ungleich der Schwester-substanz, R848, aktiviert Imiquimod - R837 ausschliesslich TLR 7 und nicht TLR 8 (Lee et al., 2003). TLR 7 gehört zu den intrazellulär exprimierten TLRs, seine Aktivierung erfolgt

nach bisherigen Erkenntnissen ausschließlich im endosomalen Kompartiment (Blasius & Beutler, 2010).

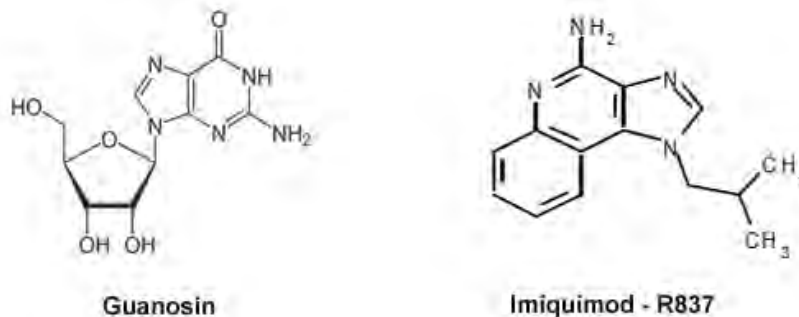


Abb. 5: Strukturformeln von Guanosin und Imiquimod - R837

Imiquimod führt durch direkte Stimulation des angeborenen Immunsystems zu einer MyD88 abhängigen Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (u.a. TNF α , IL-12). Hierdurch werden aktivierte, naive T-Zellen in Richtung zellvermittelter Immunreaktion (Th1) gelenkt und letztlich die Bildung zytotoxischer Effektoren angestoßen (Hemmi et al., 2002).

Für die effektive, angemessene und gezielte Reaktion des adaptiven Immunsystems ist die Erkennung von PAMPs (pathogen-associated-molecular-patterns) durch PRRs (pathogen recognition receptors), die integraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind, unerlässlich. Eine zentrale Bedeutung für die Einleitung der oben beschriebenen Immunantwort besitzen dendritische Zellen (DC) und Makrophagen. Beide Zelltypen gehören zur Familie der Antigen-präsentierenden Zellen, welche TLRs in großer Anzahl exprimieren.

Die pharmakologische Modulation von DCs und Makrophagen durch Imiquimod könnte von therapeutischem Wert sein. Imiquimod wird topisch gegen Erkrankungen, die durch das Humane Papillomavirus verursacht werden, eingesetzt und zeigt vielversprechende Ansätze bei verschiedenen anderen Erkrankungen der Haut. DNA-Vakzine haben sich prophylaktisch und therapeutisch als wirksam gegen natürliche Papillomavirus Infektionen erwiesen, was eine Verwendung von Imiquimod als Impfstoffbestandteil interessant machen könnte (Harrison et al., 2001)

Das lyophilisierte Imiquimod – R837 wurde mit Aqua ad injectionem in einer Konzentration von 1 mg/ml angesetzt und bis zum Versuchsbeginn bei -40°C gelagert. Lokale (SC) und

systemische (IP) Injektionen der Versuchstiere wurden mit einer hohen (5 mg/kg) oder einer niedrigen (1mg/kg) Dosis durchgeführt. Das Injektionsvolumen wurde mit Aqua ad injectionem auf einen Milliliter aufgefüllt.

2.2.4.2 ODN 1668

ODN 1668 ist ein synthetisches, Typ B CpG ODN, welches spezifisch an den murinen TLR 9 bindet und immunmodulatorische Effekte auslöst. CpG ODNs besitzen Cytosin Guanin Dinukleotide in bestimmtem Basensequenzkontext („CpG motif“). Das „p“ steht für die Phosphatbindung zwischen den beiden Basen. ODN ist das Synonym für Oligodeoxynukleotid.

CpG motifs sind in bakterieller DNA etwa 20 mal häufiger vertreten als in Säugetier DNA (Bird, 1986). Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Eu- und Prokaryonten DNA ist, dass bei Säugern 80% des vorkommenden Cytosins methyliert, bei Prokaryonten unmethyliert vorliegt (Razin & Friedman, 1981). Dadurch ist der Organismus in der Lage, zwischen „eigen“ und „fremd“ CpG motif zu unterscheiden. Konsequenterweise führen lediglich unmethylierte CpG motifs zu immunstimulatorischen Effekten über TLR 9.

Drei verschiedene CpG Typen (A, B und C), die sich in ihrer immunmodulatorischen Wirkung unterscheiden, wurden bislang identifiziert. Typ A induziert in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) eine hohe IFN α Produktion während die TLR 9 abhängige NF- κ B Aktivierung nur gering ausfällt. Typ B ODNs besitzen eines oder mehrere CpG motifs (Abb. 6) und ein komplettes Phosphorothioat Gerüst, was zu Nukleasestabilität führt. Sie erzeugen eine starke B-Zell Aktivierung, lösen allerdings nur eine schwache IFN α Produktion aus. Typ C vereint die Eigenschaften der Typen A und B in sich (Marshall et al., 2005).



Abb. 6: Basensequenz des ODN 1668. Das immunmodulatorisch wirkende, zentral gelegene „CpG motif“ ist vergrößert und unterstrichen dargestellt.

Die TLR 9 exprimierenden Zellpopulationen unterliegen einem speziesspezifischen Verteilungsmuster. Zellen der myeloiden Linie tragen TLR 9 bei Mäusen während bei Menschen pDCs und B-Zellen TLR 9 exprimieren (Bauer et al., 2001; Hornung et al., 2002; Takeshita et al., 2001). Der murine TLR 9 findet sich ausschliesslich als homodimer auf Endosomen- und nicht auf Zellmembranen. Nach Exposition erreichen CpG ODNs durch Endozytose das Endosom, wo der Kontakt mit dem TLR 9 erfolgt (Ahmad-Nejad et al., 2002). Es kommt zu einer MyD88 abhängigen Aktivierung von IRAK 1, -2 und -m und zur Signaltransduktion via TRAF6 mit anschließender Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP1, CEBP und CREP (Hacker et al., 2000; Wesche et al., 1997). Diese führen zur Expression spezieller Gene, welche zur vermehrten Bildung von Chemokinen führen.

Interessant könnte die klinische Anwendbarkeit von CpG-DNA sein, da die wöchentliche Gabe in adjuvantsüblichen Dosen an BALB/c-Mäusen über einen Zeitraum von vier Monaten zu keiner nachweisbaren Schädigung der Organe führte, und den Allgemeinzustand der Tiere nicht negativ beeinflusste (Klinman et al., 1997).

Mehrere Phase-I-Studien haben bisher keine negativen Effekte von CpG-DNA auf den menschlichen Organismus belegt (Wang, 1998).

Das lyophilisierte ODN 1668 wurde mit Aqua ad injectionem in einer Konzentration von 1 mg/ml unmittelbar vor Versuchsbeginn angesetzt. Lokale (SC) und systemische (IP) Injektionen der Versuchstiere wurden mit einer hohen (5 mg/kg) oder einer niedrigen (1mg/kg) Dosis durchgeführt. Das Injektionsvolumen wurde mit Aqua ad injectionem auf einen Milliliter aufgefüllt.

2.2.5 TELEMETRIE

2.2.5.1 AUFZEICHNUNG VON KÖRPERTEMPERATUR, MOTORISCHER AKTIVITÄT, FUTTER- UND WASSERAUFNAHME

Die telemetrischen Untersuchungen fanden in einem separaten Raum mit telemetrischem System bei einer Temperatur von 25° C statt. Die Hell-Dunkel-Phasen wurden entsprechend denen der Aufzuchtphase angepasst um die Umgewöhnungsphase so kurz und stressfrei wie möglich zu gestalten.

Drei Tage vor Versuchsbeginn wurden die Tiere einzeln in spezielle Messkäfige aus transparentem Plexiglas umgesetzt, in welchen sie während des restlichen Experiments verblieben. Die Käfige waren mit abnehmbaren Deckeln mit Luftlöchern und einem verschliessbaren Übergang in der Seitenwand versehen, über den das auf einer Waage plat-

zierte Futter erreicht werden konnte. Zur präzisen Bestimmung der Futteraufnahme wurden die Pellets geschrotet *ad libitum* angeboten. Wasser war über eine Nippeltränke, die mittels eines Schlauchs mit der auf einer Waage platzierten Wasserflasche verbunden war, erreichbar.

Die Tiere wurden vom Vortag der Senderimplantation an bis zum Versuchsende täglich um 10:00 Uhr gewogen und mit der Hand fixiert. Dies diente der Durchführung der Nachsorgeuntersuchungen im Anschluss an die Implantation des Radiotransmitters und zur Gewöhnung, um den Stress für die Tiere am Tag der Injektion auf ein Minimum zu reduzieren. Auch die Injektion der TLR Agonisten wurde um 10:00 Uhr durchgeführt.

Die intraperitoneale Injektion erfolgte in der *Regio umbilicalis* rechts und links der Medianen. Vor der Applikation wurde aspiriert um ein Injizieren in Darm, Blase oder Blutgefäßsystem zu vermeiden. Das Injektionsvolumen der Substanzen wurde mit Aqua ad injectionem auf 1 ml aufgefüllt. Um eine bessere Verteilung zu erreichen, wurden je 0,5 ml rechts und 0,5 ml links der Medianen injiziert.

Bei der subkutanen Injektion in den airpouch wurde das Volumen ebenfalls auf 1 ml aufgefüllt und vor der Injektion aspiriert, um die richtige Lage der Kanüle zu überprüfen.

2.2.5.2 STATISTIK UND AUSWERTUNG DER TELEMETRISCHEN DATEN.

Neben Körpertemperatur, Gewicht und Aktivität wurde die tägliche Futter- und Wasseraufnahme der Tiere erfasst.

Die Aufzeichnung der Temperatur- und Aktivitätsdaten erfolgte mit dem Computerprogramm VitalView in fünf Minuten Intervallen. Die Aufzeichnung des Wasser- und Futterverbrauchs in fünf Minuten Intervallen mittels des Programmes Dietmax.

Die Daten wurden anschließend zur Auswertung in OpenOffice„calc“ übertragen, wo Mittelwerte, Standardabweichungen, sowie Standardfehler (Standard Error of the Mean, S.E.M.) errechnet wurden. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Prism.

Bei der Temperaturmessung wurde die Körpertemperatur als Kurvendiagramm in 15 Minuten Intervallen über die Zeit dargestellt. Gezeigt wird der Zeitraum zwischen 120 Minuten vor Injektion bis 24 Stunden nach Injektion mit den jeweiligen Standardfehlern. Die kumulative Aktivität wurde am Injektions- und Folgetag, in Hell- und Dunkelphase getrennt, als Balkendiagramm dargestellt, da die Tiere physiologisch in der Dunkelphase eine wesentlich höhere Aktivität zeigen als in der Lichtphase. Ebenso wie bei der täglichen Gewichts-differenz wurden bei Futter- und Wasseraufnahme Mittelwert und Standardfehler verwendet, um Balkendiagramme zu erzeugen. Gezeigt werden jeweils der Tag vor und nach der

Injektion sowie der Tag der Injektion selbst. Pro Versuchsgruppe wurden zwischen fünf und acht Tiere verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms StatView. Um die Signifikanz der zu vergleichenden Fieberkurven mit den Kontrollkurven zu ermitteln, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen durchgeführt. Es folgte der post-hoc Test nach Bonferroni (Sachs, 2004) auf 5% Niveau. Die übrigen Daten (12h-Aktivität, Futter-, Wasserverbrauch, Körpergewicht) wurden mittels einfaktorieller ANOVA und nachfolgendem Bonferroni Test verglichen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ lagen statistisch signifikante Unterschiede vor.

2.2.6 ORGANENTNAHME FÜR PCR UND IMMUNHISTOCHEMIE

2.2.6.1 GERÄTE- UND MATERIALLISTE III

Heparin-Natrium 25000 ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm – DE

Pentobarbital-Natrium, Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos – DE

Perfusionsanlage, W.G.Kerkhoff Institut, Bad-Nauheim – DE

Silkafix®, 2,5 cm x 9,2 m, Lohmann Rauscher International GmbH & Co.KG,
Rengsdorf – DE

2.2.6.2 TRANSKARDIALE PERFUSION

Zur Gewinnung der im Weiteren untersuchten Gewebe (Gehirn, Leber, Milz) wurden die Tiere 120 oder 360 Minuten nach Injektion des jeweiligen TLR Agonisten oder der Kontrolllösung mit eiskalter Kochsalzlösung transkardial perfundiert. Dazu diente ein Pumpensystem mit aufsteckbarer Knopfkanüle und dazugehöriger Ablaufwanne mit aufgelegtem Gitter.

Die Tiere wurden mit Pentobarbital (160 mg/kg IP) tief narkotisiert und nach Erlöschen des Flexorreflexes aus dem „airpouch“ eine Lavage-Probe entnommen. Hierzu wurde ein Milliliter Aqua ad injectionem in den „airpouch“ instilliert, dieser etwa zehn Sekunden massiert, eröffnet und soviel wie möglich der Flüssigkeit zurückgewonnen.

Anschliessend wurden die Tiere auf dem Gitter der Ablaufwanne in Rückenlage gebracht und mit Silkafix® fixiert. Das *Abdomen* wurde halbkreisförmig entlang des Rippenbogens eröffnet, das Zwerchfell im Ansatz von der Thoraxwand gelöst und die Rippen auf Höhe der Rippenfuge durchtrennt. Eine Klemme wurde am *Cartilago xyphoideus* angebracht, wodurch die ventrale Thoraxwand nach oben geklappt wurde, der *Thorax* frei zugänglich war und das *Pericard* stumpf abpräpariert werden konnte.

Aus dem linken *Ventrikel* wurde mittels einer heparinisierten Spritze eine Blutprobe entnommen, durch die Einstichstelle die mit dem Pumpensystem verbundene Knopfkanüle durch *Ventrikel* und *Atrium* bis in den *Arcus aortae* geschoben und die Perfusionsanlage in Betrieb genommen. Durch gleichzeitige Eröffnung des rechten *Atriums* und Einstellen eines definierten Drucks entsprechend dem mittleren arteriellen Blutdruck der Ratte (100 mmHg) an der Perfusionsanlage wurde ein gleichmässiger Durchfluss der Kochsalzlösung durch das Blutgefäßsystem des Tieres gewährleistet.

Zur Perfusion eines Tieres waren ca. 400 ml Kochsalzlösung nötig. Eine blasse Farbe von Lunge und Leber wurde als Zeichen guter Ausblutung gewertet und die Perfusionsanlage gestoppt.

Der Kopf des Tieres wurde abgetrennt und der Bereich vom *Os nasale* bis zum zweiten Halswirbel von Haut und Muskulatur befreit. Von *caudal* nach *cranial* wurde die Schädeldecke abpräpariert und die *Meninx* entfernt. Folgend wurden die Hirnnerven, ebenfalls von *caudal* nach *cranial* durchtrennt, die Hypophyse am Hypophysenstiel abgesetzt und in der *Sella turcica* belassen. Zuletzt wurden mit einem Spatel die *Filae olfactoriae* durchstossen und das so mobilisierte Gehirn aus dem *Cavum cranii* entnommen. Es wurde entlang der *Fissura transversa cerebelli* in *Cerebrum* und *Cerebellum* mit *Medulla oblongata* getrennt, der *Hypothalamus* mit Tissue Freezing Medium® überschichtet und beide Teile in Trockeneis schockgefroren.

Desweiteren wurden der *Lob. medialis sinister* der Leber und die Milz entnommen. Beide Gewebe wurden ebenfalls nach Entnahme in pulverisiertem Trockeneis schockgefroren. Nach vollständigem Durchfrieren wurden sie in Parafilm und anschliessend in Aluminiumfolie gewickelt und bis zur weiteren Verwendung bei -55° C in luftdicht verschlossenen Kunststoffbeuteln gelagert.

2.2.6.3 AUFBEREITUNG VON BLUT- UND LAVAGEPROBEN

Die entnommenen Blut- und Lavageproben wurden mehrmals vorsichtig geschwenkt, in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt und auf Eis gelagert. Nach Beendigung der Perfusion wurden die Proben mit einer Mikrozentrifuge zentrifugiert (7000 rpm, 10 min.) und schliesslich der Überstand abpipettiert. Dieser wurde bis zur Durchführung der Bioassays bzw. des ELISA bei -20 °C gelagert.

2.3 MOLEKULARE UNTERSUCHUNGEN

2.3.1 PLASMAPROBENANALYSE

2.3.1.1 GERÄTE- UND MATERIALLISTE IV

96-wells microtiter plates, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

Actinomycin D (Zytostatikum), Stocklösung 1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – US

Biotinylated anti-rat IFN γ , Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

Biotinylated Antibody Diluent, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

Chromogen TMB, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

Elisa-Reader Digiscan, Asys Hitech, Eugendorf – AT

Gewebekulturflaschen, steril mit Filter: 50 ml, 75 ml, 250 ml, 550 ml,
Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster – AT

Gewebekulturplatte, steril, mit Abdeckplatte, 96K,
Greiner Bio-One GmbH, GmbH, Kremsmünster – AT

H₂SO₄, Stop Reagent, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

HRP Diluent, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

IL-6 Assay Medium, 45 ml RPMI Medium, 4 ml FCS (Fetales Kälberserum),
0,5 ml Glutamin, 125 μ l Mercaptoethanol, 65 μ l Gentamicin, Rothwell Park
Memorial Institute, Medium 1640, Fa. Life Technologies, Paisley – GB

IL-6 Qualitätskontrollen, QK 1: 500 μ l IL-6 [10 IU/ml], QK 2: 500 μ l IL-6 [30 IU/ml], National
Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar – GB

IL-6 Standard, human IL-6, code 89/548, National Institute for Biological Standards and
Control (NIBSC), Potters Bar – GB

Inkubator, Cellstar SWJ500DVBA, Queue Systems Inc., Asheville, NC – US

Isopropanol/HCL-Lösung, 4 ml 2N HCl, 196 ml Isopropanol, Merck, Darmstadt – DE

Mikroflow™, Sicherheitswerkbank Klasse 2, Modell 20229, Nunc, Wiesbaden – DE

MTT - Lösung (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazolium- bromid,
0,1 g MTT in 20 ml PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis MO – US

plastic cover, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

PS-Röhrchen, steril, 3,5 ml, 12 ml, 15 ml, 50 ml,
Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster –AT

Rat IFN γ Standard, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

Research® 8-Kanal-Pipette 30 - 300 μ l, Eppendorf AG, Hamburg – DE

Standard Diluent Buffer, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

Streptavidin-HRP, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

TNF-Standard, muriner TNF α , code 88/532, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar – GB

TNF α Assay-Medium, 500 ml RMPI Medium, 55 ml FCS (Fetales Kälber- serum), 5 ml Penicillin-Streptomycin, 5 ml Glutamin, Rothwell Park Memorial Institute, Medium 1640, Fa. Life Technologies, Paisley – GB

TNF α Qualitätskontrollen, QK 1: 500 μ l TNF [10 pg/ml], QK 2: 500 μ l TNF [25 pg/ml], National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Potters Bar – GB

Trypsin, 25%, Biochrom, Berlin – DE

Wachstumsmedium, Assay-Medium + 500 I.U. IL-6-Standard/ml, eigene Herstellung

Washing Buffer, Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln – DE

Zentrifuge, 5414S, Eppendorf AG, Hamburg – DE

2.3.1.2 NACHWEISMETHODEN FÜR ZYTOKINE (ELISA VS. BIOASSAY)

Um Zytokine in biologischen Flüssigkeiten oder Geweben zu quantifizieren, stehen prinzipiell zwei Methoden zur Verfügung: entweder der immunologische Nachweis des Proteins mittels ELISA (Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay) oder zytokinspezifische Zellkultur-abhängige Bioassays.

Der Vorteil des ELISA besteht in der einfachen Handhabung und schnellen Durchführung. Allerdings ist die Methode dadurch limitiert, dass unter Umständen auch die biologisch inaktive Zytokinfraktion gemessen wird und die verwendeten Antikörper eine geringe Kreuzreaktivität gegenüber den Zytokinen verschiedener Spezies aufweisen, so dass für jede Spezies ein eigener ELISA nötig wäre.

Der Vorteil der Bioassays liegt in der hohen Sensitivität und speziesunabhängigen Einsetzbarkeit. Der Nachteil ist die komplexe und langwierigere Durchführung. Aufgrund der langjährigen, erfolgreichen, institutsinternen Anwendung von Bioassays zum Nachweis der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α (Harré et al., 2003; Roth et al., 2006; Wuchert et al., 2008, 2009) entschieden wir uns für diese Methode der Zytokindetektion. Da für IFN γ kein geeigneter Bioassay verfügbar war, wurde dieses Zytokin mittels eines Ratten-spezifischen IFN γ -ELISAs nachgewiesen.

Das Prinzip der Bioassays beruht auf der Eigenschaft von Zytokinen bei bestimmten Zelllinien biologische Reaktionen auszulösen, in unserem Fall das dosisabhängige Absterben muriner Fibrosarkom Zellen im TNF α Assay und die Zellproliferation bei Hybridoma B9 Zellen im IL-6-Assay. Die Effekte korrelieren jeweils direkt mit der vorliegenden Menge ak-

tiven Zytokins (Mosmann, 1983), welche anhand einer Farbreaktion photometrisch bestimmt wurde.

Gemessen wurde die Umsetzung des gelben MTT-Tetrazoliumsalzes (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] 2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) durch Einwirkung der Succinyl-Dehydrogenase in den Mitochondrien lebender Zellen zu dunkelblauen, bis violetten MTT-Formazan-Kristallen (Abb. 7) (Ibelgaufits, 1995; Mosmann, 1983). Nach Lyse von Zellen und Formazan-Kristallen mittels eines Gemischs aus Isopropanol und HCl konnte die Intensität der Farbreaktion durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt werden.

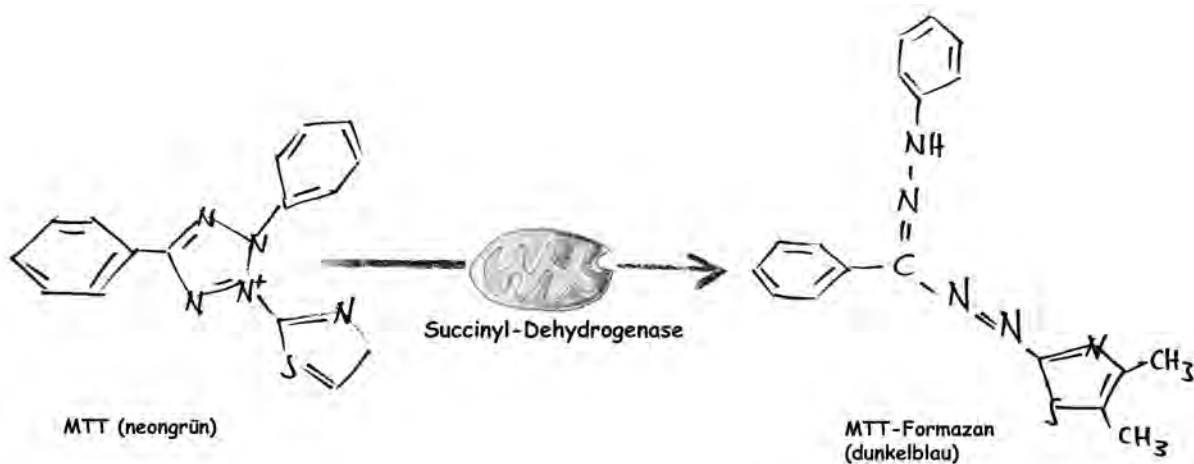


Abb. 7: Strukturformeln von MTT-Tetrazolium und dem nach Umsetzung in Mitochondrien lebender Zellen entstanden Reaktionsprodukt MTT-Formazan.

2.3.1.3 IL-6 BIOASSAY

Die 1986 entwickelte Hybridoma Zelllinie B9 (Lansdorp et al., 1986) wird durch bioaktives IL-6 dosisabhängig zur Proliferation angeregt. Das heißt, dass anhand der Zahl gewachsener Zellen in einem Gefäß direkt auf die in der Probe vorliegende Menge an aktivem IL-6 geschlossen werden kann.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank in einem speziellen Medium unter Zusatz von 500 I.U./ml IL-6 Standard („Wachstumsmedium“) bei 37° C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Alle drei Tage wurden die Zellen in neue Kulturflaschen passagiert, wozu unter sterilen Bedingungen 9 ml des Wachstumsmediums in eine neue Flasche pipettiert und 1 ml der Zellsuspension aus der zu passagierenden Kulturflasche hinzugefügt wurde.

Eine sterile 96-well-Mikrotiterplatte (Abb. 8) diente zur Durchführung des Assays. Diese wurde jeweils mit einer IL-6 Standardreihe, zwei verschiedenen Qualitätskontrollen (QK1, QK2) und den zu messenden Proben beschickt. Die erste Vertiefung („well“) der ersten Reihe einer Platte blieb als sogenanntes „blank“ frei, in das letzte zur Standardreihe gehörende „well“ wurde reines Wachstumsmedium gegeben.

Die Messung der Proben, Qualitätskontrollen und der IL-6 Standardreihe wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

Die IL-6 Standardreihe (grün) basierte auf rekombinantem IL-6, das von einer Ursprungskonzentration von 50 I.U./ml kontinuierlich 1 : 2 mit Assay-Medium verdünnt wurde. Die beiden Qualitätskontrollen mit bekannter Ausgangskonzentration (blau) wurden ebenfalls fortlaufend 1 : 2 verdünnt. Nach dem gleichen Schema wurden auch die zu bestimmenden Proben unbekannter Konzentration (rot) vorgelegt. Das vorgelegte Volumen entsprach in allen „wells“ 100 µl.

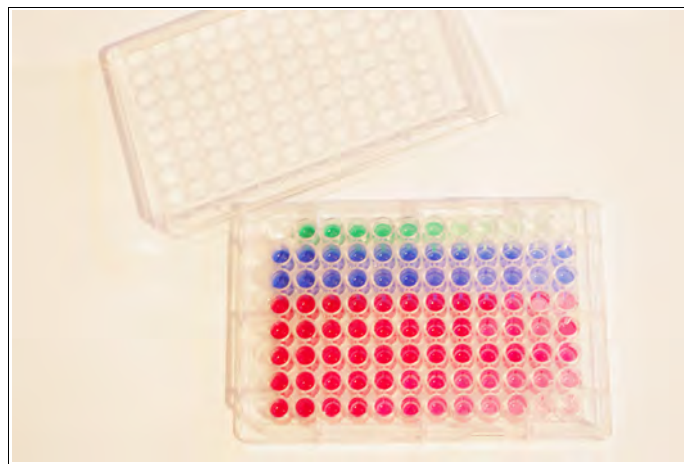


Abb. 8: Schematisches Pipettierschema einer für den IL-6 Bioassay beschickten Mikrotiterplatte. Die abnehmende Farbtintensität bei Standardreihe (grün), Qualitätskontrollen (blau) und biologischen Proben (rot) repräsentiert die bei höheren Verdünnungsstufen geringer werdende Präsenz von IL-6, wobei die unterschiedlichen Farben nicht der Realität entsprechen sondern zur besseren Anschaulichkeit gewählt wurden.

Es folgte die Zugabe von 100 µl B9-Zellsuspension in welcher sich 5000 Zellen befanden. Um diese Konzentration einstellen zu können, wurde die ursprüngliche B9- Zellsuspension dreimal zentrifugiert (2300 rpm, 10 min.) und das Zentrifugat jeweils in Assay-Medium (ohne IL-6) resuspendiert. Mit Hilfe einer Zählkammer nach Thoma wurde die vorliegende Zellzahl bestimmt, der Verdünnungsfaktor mit Hilfe einer Formel (Abb. 9) berechnet und die Zellzahl auf 50 Zellen/µl eingestellt.

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl}/K \times \text{AZ};$$

$$K (\text{Kammerfaktor}) = [50 \times 1/\text{Rauminhalt}]; \text{AZ} = \text{Anzahl der ausgezählten Felder}$$

Abb. 9: Formel zur Berechnung des Verdünnungsfaktors zur Normalisierung der Zellzahl bei der Bestimmung des TNF α und IL-6 Gehalts.

Die so beschickte Platte wurde im Brutschrank 72 Stunden inkubiert, danach 25 μl MTT pro „well“ zugegeben und nochmals 4 Stunden inkubiert. Nach Abnahme von 125 μl Zellüberstand folgte die Zugabe von 100 μl Isopropanol-HCl und eine Inkubation von 12 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur. In dieser Zeit fand die Lyse der Zellen und der Formazan-Kristalle statt.

Die Messung der OD erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge 550 nm. Aus den so gewonnenen Daten wurde zunächst eine Eichkurve erstellt, wozu die OD des IL-6 Standards gegen die IL6-Konzentration halblogarithmisch aufgetragen und die Regressionsgerade ermittelt wurde (Abb. 10).

Die lineare Komponente der Eichkurve repräsentierte die direkte Proportionalität zwischen bioaktivem IL-6 und dem Grad der Formazanbildung, welcher als Maß für das IL-6 induzierte Zellwachstum gilt. Zur Auswertung wurden nur diejenigen Proben zugelassen, deren OD im Bereich der Regressionsgeraden lag. Anhand der Regressionsgleichung der Eichkurve und des Verdünnungsfaktors konnte die in den Proben vorliegende IL-6 Konzentration berechnet werden.

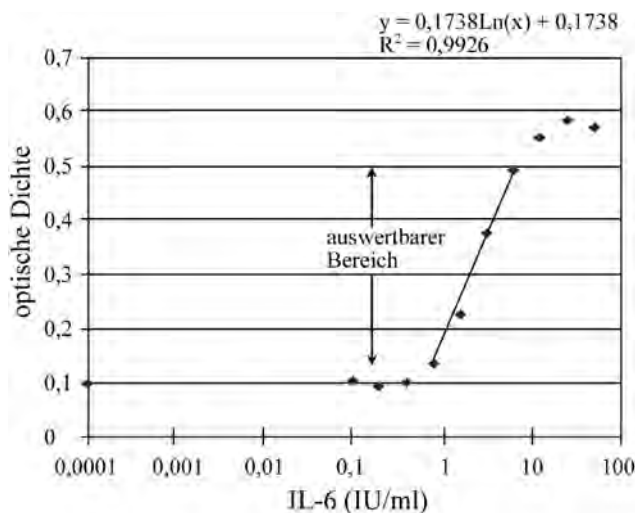


Abb. 10: Eichkurve zur Quantifizierung von IL-6. Im linearen Teil der Kurve ist die Menge an bioaktivem IL-6 direkt proportional zur Optischen Dichte (OD).

2.3.1.4 TNF α BIOASSAY

Eine murine Fibrosarkomzelllinie des Walter & Eliza Hall Instituts (WEHI-Zellen) wurde für den TNF α Assay eingesetzt. Die dosisabhängigen, zytotoxischen Auswirkungen von TNF α auf die Zellen machten es möglich, auf den TNF α -Gehalt der biologischen Proben zu schließen (Espevik & Nissen-Meyer, 1986). Die Nachweisgrenze lag bei 6 pg/ml (Ross et al., 2003).

Zur Subkultivierung wurden die adhären wachsenden WEHI-Zellen mit PBS gewaschen, mittels 25% Trypsin proteolytisch aus dem Monolayer herausgelöst und in Suspension gebracht, was sich makroskopisch als Trübung der sonst klaren Enzymlösung darstellte.

Durch Zugabe von 25 ml Wachstumsmedium erfolgte eine Hemmung der Trypsinaktivität. Von der hierdurch erhaltenen, vorverdünnten Zellsuspension wurden 1,5 ml in eine Kulturflasche mit Nährmedium überführt und im Brutschrank bei 37° C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit bei leicht geöffneter Kulturflasche inkubiert. Innerhalb von drei Tagen hafteten ca. 90% der gewachsenen Fibroblasten am Boden der neuen Kulturflasche.

Die Durchführung des Assays erfolgte analog zum IL-6 Assay, allerdings wurde die Zellzahl nach Aufbereitung auf 50.000/100 μ l eingestellt und dem Ansatz 4 μ l/ml Actinomycin D zugesetzt. Dieses diente der Hemmung des Zellwachstums und der Sensibilitätssteigerung der WEHI-Zellen gegenüber TNF α . Die Inkubationszeit mit den zu bestimmenden Proben betrug 24 Stunden.

Analog zum IL-6-Assay wurde eine Eichkurve mit Regressionsgerade erstellt und wiederum nur die Proben zur Auswertung zugelassen, welche im linearen Bereich der Regressionsgeraden lagen. Aufgrund der zytotoxischen Effekte von TNF α auf die WEHI-Zellen ist die Beziehung zwischen bioaktivem Zytokin und der Menge gebildeter Formazan-Kristalle antiproportional (Abb. 11). Die Berechnung der TNF α -Konzentrationen erfolgte analog zum IL-6-Assay mit Hilfe der Regressionsgleichung und des Verdünnungsfaktors.

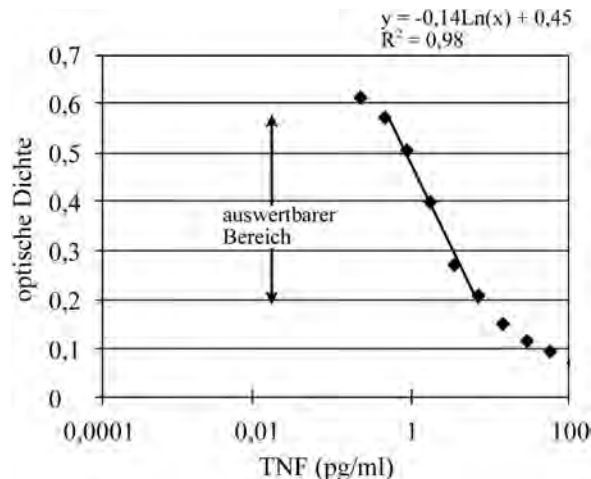


Abb. 11: Eichkurve zur Quantifizierung von TNFα. Im linearen Teil der Kurve ist die Menge an bioaktivem TNFα umgekehrt proportional zur Optischen Dichte (OD).

2.3.1.5 IFNγ ELISA

Zur Quantifizierung des IFNγ Gehalts gewonnener Plasma- und Lavageproben wurde ein Sandwich-ELISA eingesetzt. Der für die Reaktion notwendige monoklonale, gegen Ratten-spezifisches IFNγ gerichtete („coating“) Antikörper war auf dem Mikrotiterstrip des ELISA verankert und so am Untergrund fixiert, so dass er während der Waschschriffe nicht abgespült wurde. Die Probe und der biotinylierte, ebenfalls gegen Ratten spezifisches murines IFNγ gerichtete Detektions-Antikörper wurden gleichzeitig inkubiert.

Der ELISA wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und alle Proben als Doppelbestimmung angelegt. Die Nachweisgrenze des verwendeten Testsystems lag bei 10 pg/ml. Es wurde eine doppelte IFNγ Standardreihe angelegt die von 31,25 bis 1000 pg/ml reichte. Mit den Messwerten der Standardreihe wurde später eine Eichkurve erstellt (Abb. 12). Das Lösungsmittel der Standardreihe diente als Negativkontrolle.

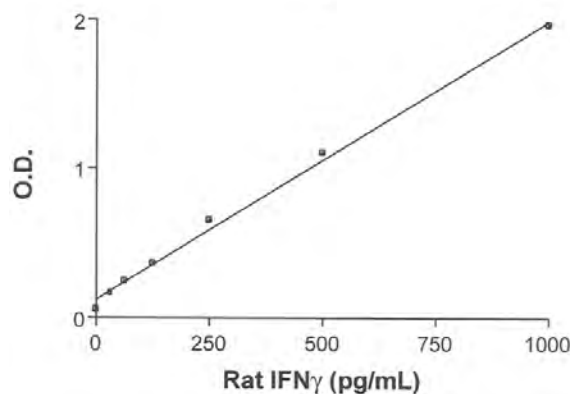


Abb. 12: Eichkurve zur Quantifizierung von IFNγ. Im linearen Teil der Kurve ist die Menge an immunoreaktivem IFNγ direkt proportional zur Optischen Dichte (OD).

Je 100 µl der zu messenden Proben wurden zeitgleich mit 50 µl des biotinylierten anti-rat IFN γ Antikörpers in die dafür vorgesehenen „wells“ pipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von drei Stunden und anschließende dreimalige Waschung mit dem mitgelieferten Waschpuffer. Dann wurden 100 µl Streptavidin-HRP Lösung in alle „wells“ gegeben.

Es wurde für 20 Minuten inkubiert, die „wells“ entleert und erneut gewaschen.

Schließlich wurden 100 µl TMB (als Substrat für die HRP und Chromogen) pro „well“ zugegeben und 15 Minuten abgedunkelt inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden pro „well“ 100 µl Schwefelsäure hinzugefügt, was zu einem Farbumschlag nach Gelb führte. Der Grad der Gelbfärbung wurde unverzüglich im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen und war proportional zur vorliegenden IFN γ Menge.

2.3.1.6 STATISTIK UND AUSWERTUNG DER ZYTOKINDATEN

Die ermittelten Zytokinkonzentrationen (IL-6, TNF α und IFN γ) wurden mit dem Programm Prism 4.0 grafisch dargestellt und mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und post-hoc Test nach Bonferroni (Sachs, 2004) auf 5% Niveau geprüft. Hierzu diente das Programm StatView®. Da die IL-6 und TNF α Werte nicht normalverteilt waren, wurden sie vor ihrer statistischen Behandlung logarithmiert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ lagen statistisch signifikante Unterschiede vor.

2.3.2 SCHNEIDEN DER ORGANE AM GEFRIERMİKROTOM (KRYOSTAT)

Um die Gehirne der perfundierten Tiere für PCR und Immunhistochemie nutzbar zu machen, wurden am Kryostaten transversal geschnittene Scheiben hergestellt. Die Innenraumtemperatur des Gerätes wurde auf -20 bis -25 °C und die Objekttemperatur auf -8 bis -13 °C eingestellt.

Zur Aufnahme der Schnitte dienten mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger, welche im Innenraum des Geräts vorgekühlt wurden. Poly-L-Lysin verbesserte durch seine positive Ladung, welche mit den negativen Ladungen des Gewebes wechselwirkte, die Adhäsion der Schnitte und verhinderte so deren Ablösung während der weiteren Bearbeitung. Die Gewebe wurden mit Tissue Freezing Medium® auf dem Objektblock fixiert. Das *Cerebrum* von *rostral*, das *Cerebellum* von *kaudal* beginnend geschnitten, wobei die in der Immunhistochemie verwendeten CVOs *Organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) und *Area postrema* (AP), in 20 µm dicken Scheiben geschnitten und direkt von der Klinge auf den Objektträger aufgebracht wurden.

Die für die PCR verwendete Region des Hypothalamus erstreckte sich in der Transversalebene vom *Nucleus preaopticus medianus* (MnPO) bis zur *Eminentia mediana* (ME). Diese Region des Gehirns wurde in 80 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger übereinander aufgebracht, so dass ein Stapel aus ca. 25 Schnitten entstand, aus welchem anschliessend die hypothalamische Region ausgeschnitten und in der *Medianebene* in zwei Hälften geteilt wurde. Diese wurden jeweils in ein PCR taugliches Eppendorf Gefäß überführt und ebenso wie die angefertigten Gehirnschnitte bis zum Beginn der weiteren Untersuchungen in Kunststoffboxen bei -55° C gelagert.

Von Leber und Milz, die ausschließlich für die PCR vorgesehen waren, wurden ebenfalls Stapel aus 10 – 15 konsekutiven 80 µm dicken Scheiben für die spätere Untersuchung vorbereitet und ebenfalls in Kunststoffboxen bei -55° C gelagert.

2.3.3 QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION (QRT-PCR)

2.3.3.1 GERÄTE- UND MATERIALLISTE V

5 x First Strand Buffer, Invitrogen, San Diego, CA – US

Chloroform, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – US

Deoxynucleotide (dNTP) Mix; 10 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – US

DEPC H₂O, 0,1% DEPC in Aqua bidest., autoklaviert nach 24 stündigem Rühren,
eigene Herstellung

Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – US

DTT 0,1 M, Invitrogen, San Diego, CA, – US

Ethanol absolut, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – US

Homogenisator, SONOPULS, Bandelin Electronic GmbH & Co KG, Berlin – DE

Isopropanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – US

M-MLV Reverse Transcriptase; 200 U/µl, Invitrogen, San Diego, CA – US

MicroAmp® Fast 8-Tube Strip 0.1 ml, Applied Biosystems, Foster City, CA - US

MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate 0.1 ml, Applied Biosystems, Foster City, CA - US

MicroAMP™ 96- Well Support Base, Applied Biosystems, Foster City, CA - US

MicroAMP™ 96- Well Tray for VeriFlex™ Blocks, Applied Biosystems, Foster City, CA - US

MicroAMP™ optical 96- Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Foster City, CA - US

Mikro Küvette (45 mm x 12,5 mm x 12,5 mm; Schichtdicke 10 mm) aus Quarzglas
Suprail®, Helma Analytics, Mühlheim – DE

Optical Adhesive Cover, Applied Biosystems, Foster City, CA - US

Optical Flat Cap 8 / strip, Applied Biosystems, Foster City, CA - US

Random Hexamers (Random primers); 50 µM in 10 mM Tris-HCl; pH 8,3;
Applied Biosystems, Foster City, CA – US
RNase ZAP®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO – US
StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA – US
TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA – US
TRIzol Invitrogen, San Diego, CA – US
Zentrifuge, Megafuge 1.0 R, Thermo Scientific Waltham, MA – US

2.3.3.2 GRUNDLAGEN

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist ein enzymabhängiges Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter Gensequenzen („target DNA“) eines ein- oder doppelsträngigen DNA-Moleküls (Mullis & Faloona, 1987).

Außer der sich in Lösung befindenden Gensequenz benötigt man zur Durchführung DNA-Polymerase (um die Reaktion zu katalysieren), die vier Nukleotide (als Bausteine der neu zu synthetisierenden DNA) und Primer, welche komplementär zu den Enden des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts sind.

Ein PCR Zyklus besteht aus Strangtrennung (Denaturierung), Primer Bindung („annealing“) und DNA-Synthese (Amplifikation), dauert etwa zwei Minuten und läuft vollautomatisch in einem „Cycler“ ab. Es werden 30 bis 40 Zyklen durchgeführt, wobei sich die Ausgangsmenge an DNA stark vervielfacht. Die Limitierung für die Zahl der Zyklen stellt die Akkumulation der zwar seltenen, aber dennoch auftretenden Fehler dar. Wichtiges Kriterium ist die Thermostabilität der Polymerase, da der Reaktionsansatz auf über 90° C erwärmt wird. Verwendet wird die Polymerase I aus *Thermus Aquaticus* („Taq-Polymerase“).

Klassischerweise erfolgt nach der Vervielfältigung der DNA die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente auf ein Agarose-Gel und die Färbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff, wie z.B. Ethidiumbromid. Anschließend können die DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht werden (Kemp et al., 1989). Durch einen parallel aufgetragenen Größenmarker lässt sich die relative Größe des DNA-Amplifikats bestimmen (Mullis & Faloona, 1987). Bei der herkömmlichen PCR findet die Bestimmung der Ausgangsmenge an RNA oder DNA durch Auswertung der Bandenstärke im Agarosegel bzw. der Ethidiumbromid-Fluoreszenz statt. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Endpunktbetrachtung und die Kinetik der Reaktion wird nicht berücksichtigt.

Die quantitative *real-time* PCR kombiniert die DNA Amplifikation mit der Detektion des Produktes in einem einzigen Reaktionsgefäß und ermöglicht es, die Kinetik der Reaktion in Echtzeit („real-time“) zu verfolgen. Bei einer heute gängigen Methode nutzt man den „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET) (Mullis & Faloona, 1987). Hierbei werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotide (Taq-Man® Sonden) eingesetzt. Diese sind so konzipiert, dass sie an die target DNA Sequenz binden.

Die Sonde besitzt am 5' Ende einen „Reporter“ und einen „Quencher“ am 3' Ende. Ist die Sonde intakt, wird kein Fluoreszenzsignal ausgesandt. Verlängert nun die Polymerase den DNA Strang, spaltet sie die Sonde und trennt so den Reporter vom Quencher. Der Reporter fluoresziert und das Signal wird von der real-time PCR gemessen (Abb. 13). Wenn mehr DNA synthetisiert wird, werden mehr Reporter-Moleküle freigesetzt und entsprechend steigt die Fluoreszenz und somit die Signalstärke an.

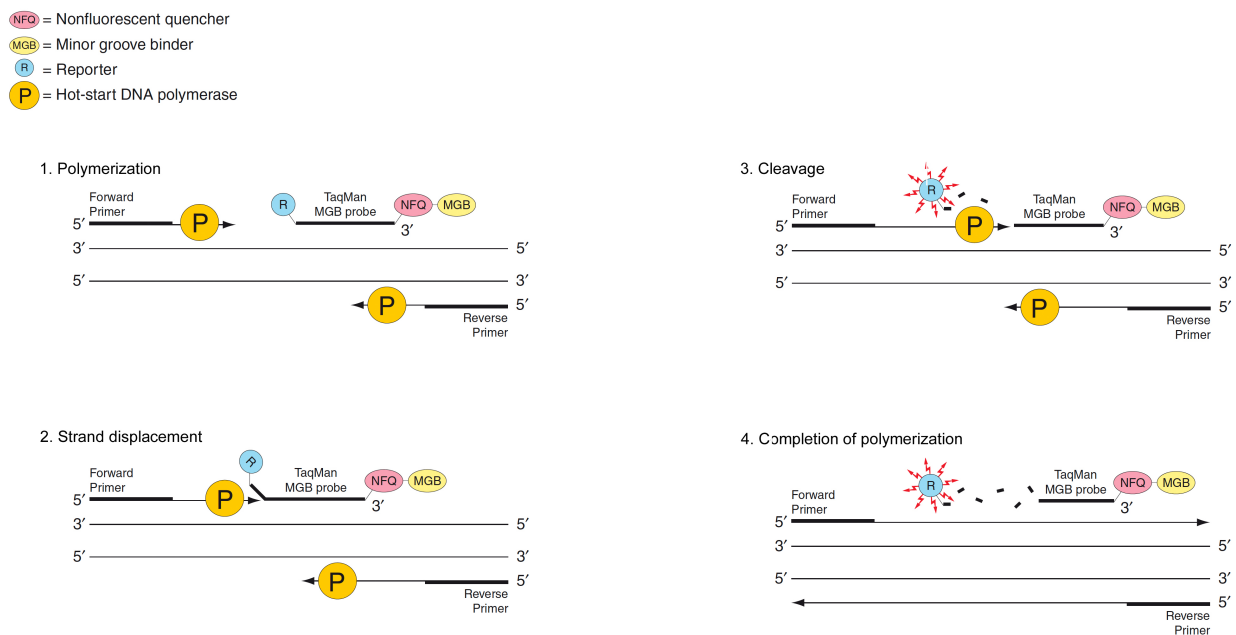


Abb. 13: Schematischer Ablauf eines PCR Zyklus mit Beginn der Polymerisation, Ab-spaltung der Sonde, Fluoreszenz und Vervollständigung der Polymerisation. Die Son-de bindet an die Target DNA Sequenz. Während der Strangverlängerung wird die Son-de von der DNA Polymerase gespalten und so der Reporter räumlich vom Quo-er getrennt, was zur Fluoreszenz des reporters führt. Abbildung aus: Applied Bio-systems „TaqMan Gen Expression Protocol“ S. 51-52.

Bei der Amplifikation der Gensequenz werden drei Phasen unterschieden (Abb. 14)

1. Exponentielle Phase: Die Ausgangsstoffe sind im Überfluss vorhanden, die Reakti-onsprodukte verdoppeln sich mit jedem Zyklus.

2. Lineare Phase: Die Ausgangsstoffe gehen zur Neige, die Reaktion verlangsamt sich.
3. Plateau Phase: Die Ausgangsstoffe sind erschöpft, die Reaktion stoppt.

Während der exponentiellen Phase werden zwei Werte bestimmt. Der Schwellenwert („threshold“) ist der Punkt, an dem die Fluoreszenz eine Intensität erreicht, die höher als die Hintergrundfluoreszenz ist. Der Zyklus, in dem diese Intensität erreicht wird, wird als „Cycle threshold“ (Ct), bezeichnet (Abb. 15).

Die real-time PCR weist eine Reihe von Vorteilen gegenüber der konventionellen PCR auf. Sie besitzt eine höhere Sensitivität, ist quantifizierbarer, schneller durchführbar da, kein Agarose-Gel notwendig ist, und sicherer, da nicht mit toxischen Substanzen wie z.B. Ethidiumbromid oder mit radioaktiven Materialien gearbeitet wird.

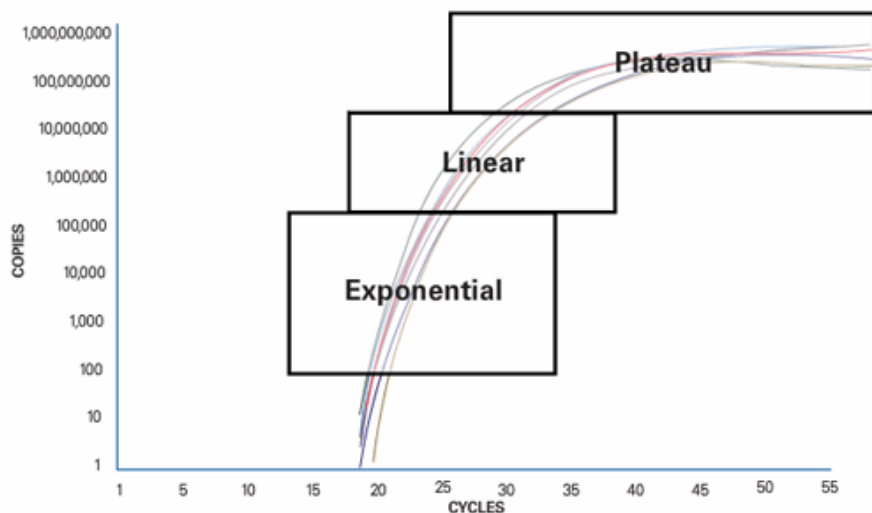


Abb. 14: Die Anzahl der amplifizierten Gensequenzkopien aufgetragen gegen die durchgelaufenen PCR Zyklen. Die farbigen Kurven repräsentieren die gemessenen Proben. Eingezeichnet sind die Exponentielle-, Lineare- und die Plateauphase der Amplifizierung. Abbildung aus: Applied Biosystems „Real-Time PCR vs Traditional PCR vs Digital PCR“.

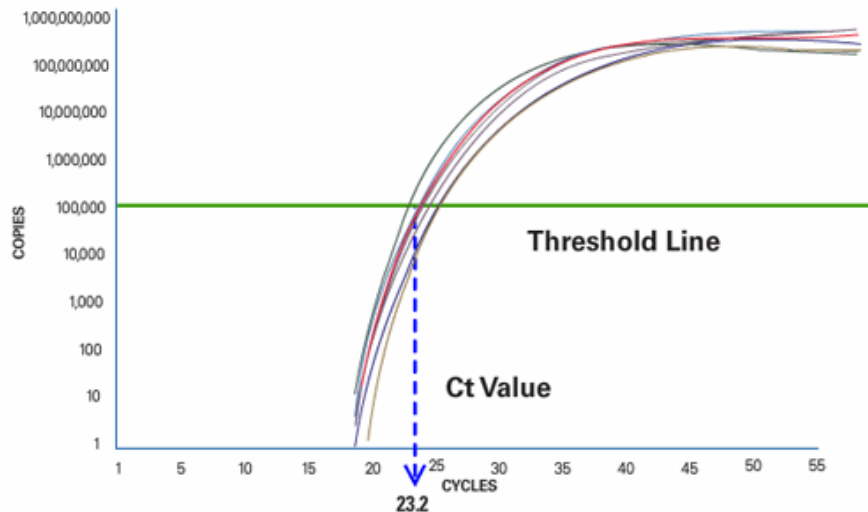


Abb. 15: Die Anzahl der amplifizierten Gensequenzkopien aufgetragen gegen die durchgelaufenen PCR Zyklen. Die farbigen Kurven repräsentieren die gemessenen Proben. Der PCR Zyklus in dem die Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt wird als „Cycle Threshold“ oder Ct bezeichnet. Abbildung aus: Applied Biosystems „Real-Time PCR vs. Traditional PCR vs. Digital PCR“.

2.3.3.3 VERSUCHSPROTOKOLL UND AUSWERTUNG DER PCR DATEN

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das gewonnene Gewebe wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und mit 500 µl Trizol am Sonicator homogenisiert, welcher vor und zwischen den einzelnen Proben gründlich gereinigt wurde.

Das Homogenat wurde bei 12.000 rpm und 4° C für 10 min zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde mit 100 µl Chloroform durch kräftiges Schütteln vermischt und erneut bei 12.000 rpm und 4° C für 20 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden Proteine, DNA und RNA in verschiedene Phasen getrennt. Die klare RNA Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit 250 µl Isopropanol versetzt. Die Interphase mit DNA und die rote, organische Phase mit der Proteinfraction wurden verworfen. Das Gemisch wurde bei -20° C über Nacht inkubiert, so dass die RNA ausfallen konnte, um sie am nächsten Tag durch erneute Zentrifugation in Pellet Form zu bringen. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet zunächst mit 70% dann mit 100% Ethanol gewaschen. Schließlich wurde es nach 20 Minuten Trocknung unter dem Abzug in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Die so gewonnene RNA wurde bei -40° C aufbewahrt.

QUANTITATIVE UND QUALITATIVE BESTIMMUNG DER RNA

Die Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte spektrophotometrisch in einer Quarz-Küvette. Verunreinigungen lassen sich durch Verhältnisbildung (Ratios) der

Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm erkennen, da Proteine maximal Licht einer Wellenlänge von 280 nm, RNA dagegen einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren. Proben mit einer E260 / E280-Ratio von 1,8 bis 2,0 wurden hinsichtlich ihres RNA-Anteils als rein bewertet. Bei einer optische Dichte OD 260 von 1,0 liegt bei einer reinen RNA-Präparation eine Konzentration von 40 µg/ml vor.

Jeweils 5 µl der gewonnenen Proben wurden mit 95 µl DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Das Photometer wurde mit 100 µl Reinstwasser auf „null“ geeicht und anschließend die Konzentration der 1:20 verdünnten RNA-Proben gemessen. Mithilfe der Konzentration und des Verdünnungsfaktors wurde das hinzuzufügende Volumen an DEPC-Wasser errechnet und die Proben auf eine Konzentration von 250 ng/µl gebracht.

cDNA SYNTHESE

Es war notwendig, die in der RNA-Präparation enthaltenen mRNAs in komplementäre cDNA Stränge umzuschreiben, die dann bei der real-time PCR als Matrize dienten.

Die im folgenden beschriebenen Substanzen lagerten bei -20°C. Für cDNA-Synthese und real-time PCR wurden diese aufgetaut, kurz zentrifugiert und auf Eis gelagert.

Von jeder Probe wurden 4 µl zusammen mit 7 µl des Reaktionsmix (Tab. 2) im real-time Cyclyer für 10 Minuten bei 65° C denaturiert, der cDNA Primer Mix (Tab. 3) hinzugefügt und für 60 Minuten bei 37° C inkubiert.

Schließlich folgte die Inaktivierung bei 90° C für fünf Minuten. Die gewonnene cDNA wurde im Verhältnis 1:10 mit autoklaviertem Wasser verdünnt und bis zur Verwendung in der RT-PCR bei -20°C gelagert.

Reagenz	Menge pro RT-Tube (µl)
<i>DEPC-Wasser</i>	5
<i>Random Hexamer</i>	1
<i>dNTPs</i>	1

Tab. 2: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die cDNA Synthese.

Reagenz	Menge pro RT-Tube (µl)
<i>RT Puffer</i>	4
<i>Steriles Wasser</i>	2
<i>0,1 M DTT</i>	2
<i>Gibco M-MLV RT</i>	1

Tab. 3: Zusammensetzung des cDNA Primer Mix für die cDNA Synthese.

REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION UND QUANTIFIZIERUNG

Für die real-time Polymerase-Kettenreaktion wurden 96-well Platten verwendet. Es wurde 1 µl der gewonnenen cDNA mit 9 µl PCR Mix (Tab. 4) in jedes Well pipettiert. Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Negativkontrollen wurde eine Probe mit DEPC-Wasser anstelle von mRNA und eine Probe welche anstatt cDNA hochreines Wasser enthielt verwendet.

Reagenz	Menge pro RT-Tube (µl)
<i>autoklaviertes Wasser</i>	3,5
<i>Mastermix</i>	5
<i>Primer</i>	0,5

Tab. 4: Zusammensetzung des PCR Mix

Die quantitativen PCR-Analysen wurden mit einem StepOnePlus Gerät mit dazugehöriger StepOne Software durchgeführt. Die untersuchten Gene sind in (Tab. 5) aufgelistet. Die Zyklusparameter waren wie folgt: 2 Minuten bei 50° C zur Aktivierung der Taq-Polymerase, gefolgt von 35 Amplifikations Zyklen für jeweils 10 Sekunden bei 95° C zur Denaturierung und für jeweils 30 Sekunden bei 60° C für das Hybridisieren der Primer und die Verlängerungsschritte. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte mittels ΔC_t -Methode.

Die Ct-Werte wurden über die Expression eines Referenzgens („Housekeeping-Gen“), in unserem Fall β -Actin, normiert ($\Delta C_t = C_t\text{-Untersuchtes-Gen} - C_t\text{-Referenzgen}$). Bei einem

Referenzgen geht man davon aus, dass es konstitutiv im Gewebe exprimiert wird und von den Versuchsbedingungen unbeeinflusst bleibt. Die Berechnung der $\Delta\Delta C_t$ -Werte erfolgte, indem der ΔC_t -Wert der jeweils am niedrigsten exprimierten Probe (als Kalibrator) von den ΔC_t -Werten der übrigen Proben subtrahiert wurde. Die n-fache Transkription von Kontrollgruppe zu Versuchsgruppe errechnet sich dann mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Diese Berechnung setzt voraus, dass in jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der DNA Menge stattgefunden hat, also die QRT-PCR Effizienz 100% bzw. 1 beträgt wie dies im exponentiellen Teil der Amplifizierung der Fall ist (Livak & Schmittgen, 2001).

Assay ID	Gen (<i>Rattus norvegicus</i>)
4352340E <i>Rat ACTB Endogenous Control (VIC/MGB Probe, Primer Limited)</i>	β - Aktin
Rn02395770_g1	IFN alpha-1
Rn00569434_s1	IFN beta-1
Rn00594078_m1	IFN gamma
Rn99999017_m1	TNF alpha
Rn00580432_m1	IL-1 β
Rn01410330_m1	IL-6
Rn01473658_g1	IkappaB alpha
Rn00585674_s1	SOCS3
Rn00824635_s1	NF-IL6
Rn00568225_m1	COX 2
Rn00572047_m1	mPGES

Tab. 5: Auflistung der untersuchten Gene in der QRT-PCR. Die TaqMan Gene Expression Assays wurden von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA bezogen.

2.3.4 IMMUNHISTOCHEMIE

2.3.4.1 GERÄTE- UND MATERIALLISTE VI

Alexa 488, Fluoresceinisothiocyanat, Sigma Aldrich, München – DE

Citifluor®, Cityfluor LTD, London - UK

Cy3- conjugated Streptavidin, 016-160-084, Jackson Immuno- Research,
West Grove, PA – US

DAPI, 4'6 – Diamidino–2-Phenylindol Dihydrochlorid, Mobitec, Göttingen – DE

Digitale schwarz-weiß Kamera, Spot Insight, Diagnostic Instruments,
Visitron Systems, Puchheim – DE

Fluoreszenzmikroskop, Olympus BX50, Olympus Optical, Hamburg – DE

Immersionsöl, Refraktionsindex 1,51, Olympus Optical, Hamburg – DE

Inkubationspuffer, PBS, 10% NDS, 0,3% Triton X, eigene Herstellung

Metamorph, Version 5.05, Diagnostic Instruments, Visitron Systems, Puchheim – DE

Normal donkeyserum (NDS), PAA, Pasching – AT

Objektträgermappen für 20 Objektträger, LAT-Labor- und Analysen-Technik GmbH,
Garbsen – DE

Pap Pen, Sigma Aldrich, München – DE

Paraformaldehyd (PFA), Merck, Darmstadt – DE

pH-Indikatorpapier, Merck, Darmstadt – DE

Phosphat buffered saline (PBS), eigene Herstellung

Stocklösung A, 0,2 M Na_2HPO_4 – Lösung, 55,2 g Na_2HPO_4 (137,99 g/mol)
in 2 l Aqua bidest. - eigene Herstellung

Stocklösung B, 0,2 M Na_2HPO_4 – Lösung, 71,2 g Na_2HPO_4 (177,9 g/mol)
in 2 l Aqua bidest. - eigene Herstellung

Triton X-100, Sigma Aldrich, München – DE

2.3.4.2 GRUNDLAGEN

Das hier angewandte Prinzip der Immunhistochmie beruht auf der Detektion spezieller Antigen-Antikörper-Komplexe mittels indirekter Immunfluoreszenz (Coons, 1958), welche Hinweise auf das Vorhandensein und die Lokalisation des gesuchten Antigens liefern.

Antikörper sind lösliche Immunglobuline (Ig) die von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen im Rahmen der adaptiven Immunantwort gebildet werden und sich im Blutplasma, anderen Körperflüssigkeiten oder auf Zellmembranen befinden. Man unterscheidet fünf Klassen von Immunglobulinen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). Alle sind biochemisch gesehen Glykopro-

teine, welche aus zwei leichten (L, light chain) und zwei schweren (H, heavy chain) Polypeptidketten bestehen, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Graphisch werden Antikörper häufig als Y dargestellt.

Durch Papain lassen sich Antikörper in ein relativ konstantes Fc-Fragment (fragment crystallizable – unterer Teil des Y) und zwei Fab-Fragmente (fragment antigen binding – oberen Teile des Y) spalten. Das im Fab-Fragment lokalisierte Paratop wird durch Anteile der leichten und schweren Polypeptidketten gebildet, ist in seiner Struktur extrem variabel und stellt die eigentliche Bindungsstelle für Antigene dar.

Als Antigene fungieren hochmolekulare Verbindungen wie Proteine, Peptide, Polysaccharide, Lipide und Polynucleotide. Die antigene Determinante, welche mit dem Paratop des Antikörpers interagiert, wird als Epitop bezeichnet. Die zwischen Epi- und Paratop eingegangene Bindung ist zunächst elektrostatischen Kräften geschuldet, so dass Antigen und Antikörper bis zum Eintritt der sekundären Antigen- Antikörper- Reaktion lediglich reversibel aneinander gebunden sind.

Man unterscheidet zwischen mono- und polyklonalen Antikörpern. Erstere stammen von einem B-Zell Klon ab und binden daher nur an ein Epitop des Antigens. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Zell Klonen gebildet und richten sich gegen verschiedene Epitope des Antigens.

Bei der hier verwendeten Methode bindet ein Fluorochrom markierter Sekundärantikörper an das Fc-Fragment des Primärantikörpers, welcher mit seinem Fab-Fragment an das Epitop des Antigens gebunden ist (Abb. 16). Zusätzlich zur doppelten Markierung durch verschiedene Antikörper (Tab. 6), wurden die Zellkerne mit Hilfe der DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Hierbei bindet der Farbstoff selektiv an DNA, so dass unspezifisch alle Zellkerne gefärbt werden. Die Sichtbarmachung der Antigen- Antikörper- Komplexe erfolgt durch Anregung des Fluorochroms mit Licht geeigneter Wellenlänge, was zur Emission von längerwelligem Licht durch die Fluorochrome führt (Tab. 7). Dieses wird mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Da die Farben bei Anregung mit Licht im UV-Bereich ausbleichen, war die Haltbarkeit der Schnitte nach Färbung, abhängig vom verwendeten Primärantikörper, zeitlich stark begrenzt und reichte von wenigen Tagen bis zu mehreren Wochen.

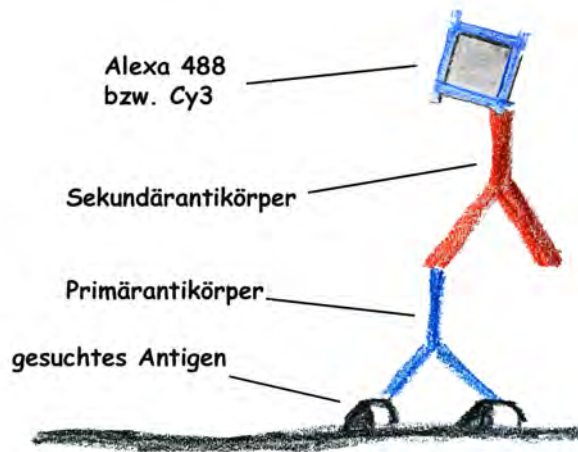


Abb. 16: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenzmethode. Die unmarkierten Primärantikörper binden mit ihrer Fab Region an das jeweilige Antigen. Im zweiten Schritt binden die Sekundärantikörper an deren Fc Region. Die Sekundärantikörper sind direkt Fluorochrom gekoppelt.

2.3.4.3 VERSUCHSPROTOKOLL UND AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOLOGISCHEN DATEN

Die tiefgefrorenen, mit Gehirnschnitten beschickten Objektträger wurden für zehn Minuten bei -20°C im Kryostat gelagert und dann für weitere 5-7 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und in 2% PFA nachfixiert, wodurch reaktive Eiweißgruppen zu Polypeptidgruppen vernetzt wurden und so die Paratope geschützt und in ursprünglicher Form erhalten blieben.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen („blocking“) mit Inkubationspuffer, wobei je nach Primärantikörper verschiedene Konzentrationen des Detergens Triton X hinzugefügt wurden um die Membrandurchlässigkeit der Zellen zu erhöhen.

Pro Objektträger wurden nun 300µl der Primärantikörperlösung aufgebracht, die aufgrund der Begrenzung mit dem Fettstift und der Oberflächenspannung auf den Schnitten verblieb. Es folgte eine 24 stündige Inkubation bei 4°C in einem mit feuchten Tüchern ausgelegten lichtundurchlässigen Schnittkasten.

Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit PBS 300µl der Sekundärantikörperlösung pro Objektträger aufgebracht und für zwei Stunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluorochrome zu vermeiden, unter möglichst lichtarmen Bedingungen durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Kernfärbung mit DAPI-Inkubationslösung, welche für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf den Objektträgern verblieb. Es wurde wiederum

dreimal mit PBS gewaschen, worauf die Schnitte mit Citifluor® überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt wurden.

Während des gesamten Prozederes war es wichtig, ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden, da dies zu Artefaktbildung führt. Die fertigen Objektträger wurden bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop in lichtundurchlässigen Mappen bei 4° C gelagert.

PRIMÄRANTIKÖRPER

Zur Detektion nukleärer (STAT3, NF-IL6, NF-κB) Signale und zur Phänotypisierung der im Zusammenhang der Studie besonders wichtigen Endothelzellen kamen polyklonale Antikörper aus verschiedenen Spezies zum Einsatz (Tab. 6).

Zur Detektion von Endothelzellen wurde ein gegen von-Willebrand-Faktor gerichteter Antikörper aus dem Schaf verwendet. Beim STAT3 Antikörper handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, welcher eine Peptidsequenz (AS 750-769) am carboxyterminalen Ende des murinen STAT3 Moleküls detektierte. Die Zielstruktur wird sowohl in der phosphorylierten, als auch in der nicht phosphorylierten Form erkannt, da sie außerhalb der TYR 705 Phosphorylierungsstelle liegt, was zur Markierung zytoplasmatischer Mono- und Dimere und nukleärer Dimere führte. Der NF-κB Antikörper aus der Ziege detektierte sowohl die inaktive (zytoplasmatische), als auch die aktive (nukleäre) Form am carboxyterminalen Ende (AS 531-550) des murinen NF-κB Peptids (Dejardin et al., 1999). Der Antikörper bindet sowohl an die inaktive p65 Untereinheit als auch an Mono- und Dimere im Zellkern. Der NF-IL6 Antikörper richtete sich gegen das carboxyterminale Ende (AS 258-276) des murinen NF-IL6 Peptids.

Die Spezifität der Detektion der Transkriptionsfaktoren im Hirngewebe der Ratte war aus der eigenen Arbeitsgruppe (Damm et al., 2011; Hübschle et al., 2001) von Studien anderer Gruppen (Nadjar et al., 2003; Stromberg et al., 2000) bekannt.

Antigen	Antikörper Herstellertierart, Typ	Konzentration, Anteil Triton X	Katalognummer, Hersteller
<i>STAT3</i>	<i>rabbit, polyclonal IgG</i>	<i>1:9000, 0,1%</i>	<i>sc-482, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA – US</i>
<i>NF-IL6</i>	<i>rabbit, polyclonal IgG</i>	<i>1:5000, 0,3%</i>	<i>sc-150, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA – US</i>
<i>NF-κB</i>	<i>goat, polyclonal IgG</i>	<i>1:500, 0,1%</i>	<i>sc-372, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA – US</i>
<i>vW</i>	<i>sheep, polyclonal IgG</i>	<i>1:3000, 0,1-0,3%</i>	<i>A 008202, Dako Deutschland GmbH, Hamburg – DE</i>

Tab. 6: Liste der verwendeten Primärantikörper

SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Der Sekundärantikörper, Alexa Fluor 488, welcher zur Charakterisierung des Endothels genutzt wurde, war wie bereits beschrieben, direkt Fluorochrom gekoppelt und gegen die Herstellertierart des Primärantikörpers gerichtet. Der Antikörper zur Detektion nukleärer Aktivität von STAT3, NF-IL6 oder NF-κB wurde mit Hilfe des Cy3 gekoppelten Streptavidins detektiert.

MIKROSKOPIE UND AUSWERTUNG

Direkt im Anschluss an die Immunhistochemie wurden die Schnitte fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet, wobei Lichtfilter mit verschiedenen Wellenlängenbereichen zur Detektion der jeweiligen Antigen-Antikörper-Komplexe eingesetzt wurden, da jeder Antikörper ein Emissionsmaximum bei einer anderen Wellenlänge aufweist (Tab. 7)

Von den untersuchten Hirnregionen wurden Fotos der Farbkanäle (rot, grün, blau) mit einer digitalen schwarz-weiß Kamera bei verschiedenen Vergrößerungen (100, 200, 400, 1000 fach) aufgenommen, und mit Hilfe des Programms Metamorph zu einem dreifarbigem Bild zusammengefügt. So konnten in einem Bild gleichzeitig das Signal, die Kolokalisation mit Endothelzellen und die (peri-) nukleäre Lokalisation des Signals dargestellt werden.

Substanz	Anregungswellenlänge (nm)	Emissionswellenlänge (nm)
<i>Alexa 488</i>	495	510 – 540 (<i>grün</i>)
<i>CyTM3</i>	550	630 – 660 (<i>rot</i>)
<i>DAPI</i>	358	641 (<i>blau</i>)

Tab. 7: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Sekundärantikörper Alexa 488, CyTM3 und des Zellkernmarkers DAPI.

3 ERGEBNISSE

3.1 LOKALE UND SYSTEMISCHE STIMULATION MIT DEM TLR 7 AGONISTEN IMIQUIMOD

3.1.1 TELEMETRISCHE DATEN

Mit Hilfe telemetrischer Untersuchungstechniken wurde analysiert, ob die Behandlung mit dem TLR 7 Agonisten Imiquimod zur Manifestation zentralnervös kontrollierter Krankheits-symptome führt. Hierzu wurden Ratten systemisch (IP) oder lokal (SC) mit Imiquimod in zwei verschiedenen Dosierungen (1 mg/kg oder 5 mg/kg) behandelt und die Reaktionen der Tiere mit denen der mit dem Lösungsmittel (Aqua ad injectionem) behandelten Ratten verglichen. Im Folgenden sind jeweils die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern dargestellt.

In die Auswertung aufgenommen wurden für die einzelnen untersuchten Parameter jeweils die Tiere, bei denen die telemetrische Aufzeichnung über den Untersuchungszeitraum von drei Tagen störungsfrei erfolgte. Daraus resultierten für die einzelnen Parameter unterschiedliche Gruppengrößen. Diese sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Gruppe	Körper- temperatur	Kumulative Aktivität	Futter- aufnahme	Wasser- aufnahme	Körper- gewicht
<i>Imiquimod, 1 mg/kg, SC</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>
<i>Imiquimod, 5 mg/kg, SC</i>	<i>n = 5</i>	<i>n = 5</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>
<i>Imiquimod, 1 mg/kg, IP</i>	<i>n = 8</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 5</i>	<i>n = 5</i>	<i>n = 5</i>
<i>Imiquimod, 5 mg/kg, IP</i>	<i>n = 8</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 8</i>	<i>n = 8</i>
<i>Aqua ad injectionem, SC</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>
<i>Aqua ad injectionem, IP</i>	<i>n = 8</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 8</i>	<i>n = 8</i>	<i>n = 8</i>

Tab. 8: In die statistische Auswertung aufgenommene Versuchstiere zur Gewinnung der telemetrischen Daten.

3.1.1.1 KÖRPERTEMPERATUR

Abb. 17 zeigt den Verlauf der Körpertemperatur der vier mit Imiquimod stimulierten Versuchsgruppen mit den jeweiligen Kontrollgruppen. Der Zeitpunkt der Injektion (time 0h) wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet und ein Zeitraum von zwei Stunden vor der Injektion als Basalwert abgebildet. Die dunklen horizontalen Balken in den Teilabbildungen repräsentieren die Nachtphase. Die Temperatur wurde in Intervallen von fünf Minuten aufgezeichnet und in Intervallen von 15 Minuten grafisch dargestellt.

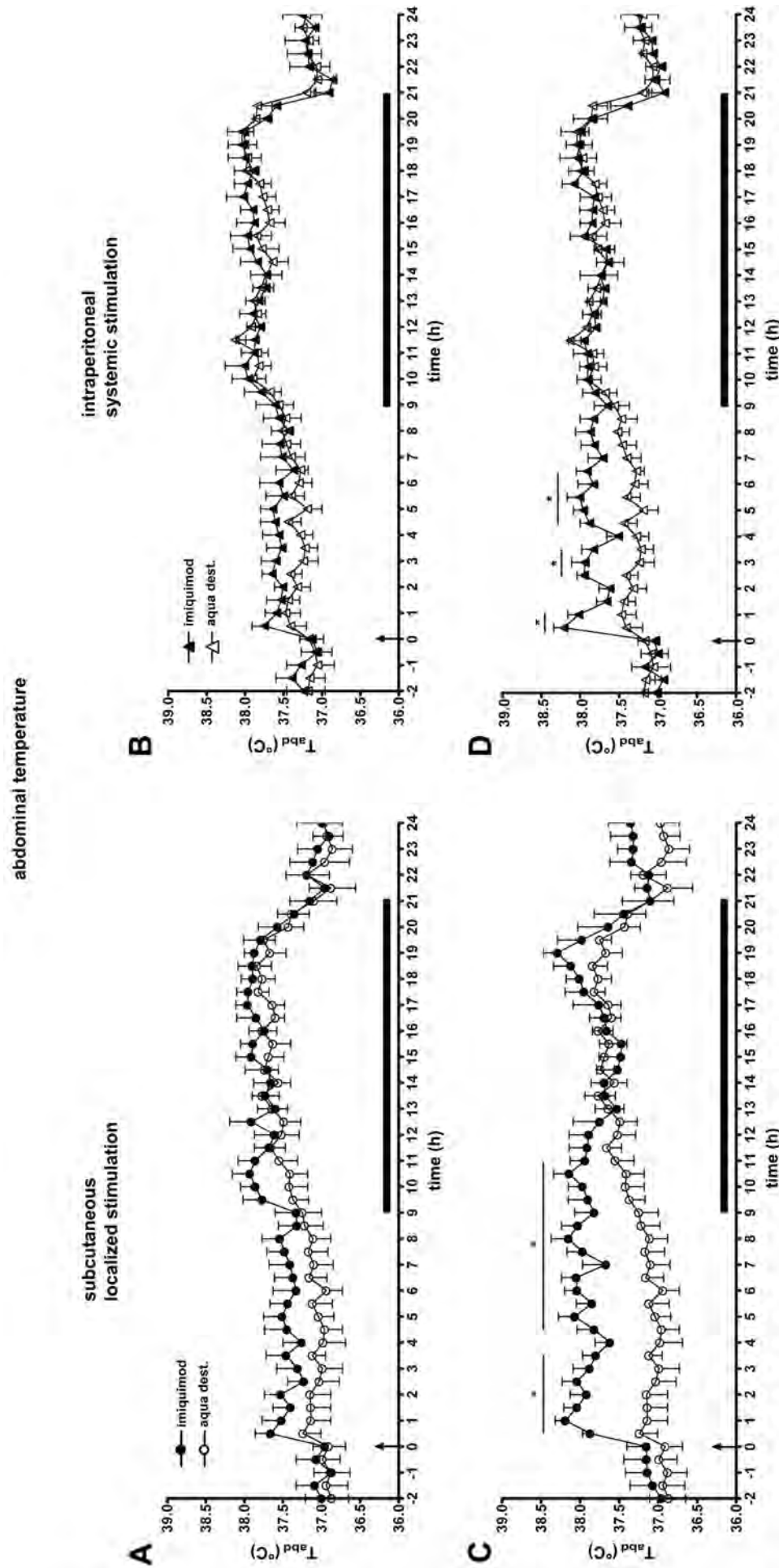


Abb. 17: Verlauf der Körpertemperatur nach lokaler (SC; A,C) und systemischer (IP; B,D) Stimulation mit Imiquimod im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den mit einem horizontalen, schwarzen Balken mit Asterisk gekennzeichneten Zeiträumen waren die Temperaturunterschiede signifikant ($p < 0,05$). Die schwarzen Balken über der X-Achse in den Teilabbildungen zeigen die Dunkelphase an. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis.

Bei allen mit Imiquimod behandelten Gruppen folgte nach der Injektion ein Anstieg der Körpertemperatur, der bei den beiden mit der hohen Dosis behandelten Gruppen signifikant höhere Werte erreichte und bei den lokal stimulierten Tieren stärker als bei den systemisch stimulierten ausfiel (Tab. 9). Die Kontrolltiere zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum den für nachtaktive Säugetiere typischen zirkadianen Temperaturrehythmus bei welchem das Minimum während der Hell- und das Maximum während der Dunkelphase zu messen ist. Bei den pyrogenbehandelten Tieren stellte sich dieser Rhythmus während der ersten Nacht *post injectionem* wieder ein und war dann nicht mehr von dem der Kontrolltiere zu unterscheiden.

Gruppe	Temperatur max. (° C)	Signifikanter Zeitraum (min)	Schnittpunkt der Temperaturkurve mit der Temperaturkurve der Kontrollgruppe (in Stunden)
<i>Imiquimod, 1 mg/kg, SC</i>	$38,02 \pm 0,16$	---	8,5
<i>Imiquimod, 1 mg/kg, IP</i>	$37,50 \pm 0,06$	---	6,5
<i>Imiquimod, 5 mg/kg, SC</i>	$38,29 \pm 0,23$	30-210; 270-630	13
<i>Imiquimod, 5 mg/kg, IP</i>	$38,21 \pm 0,13$	30-60; 150-210; 270-360	9

Tab. 9: Charakteristika der durch Imiquimod induzierten Fieberreaktion.

3.1.1.2 MOTORISCHE AKTIVITÄT

Die Analyse der motorischen Aktivität zeigte in den Hellphasen der beiden abgebildeten Tage bei der lokal (SC) mit Imiquimod (5 mg/kg) stimulierten Gruppe bezogen auf die Absolutwerte einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Bei den anderen Gruppen wurden kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe im jeweiligen Zeitraum gemessen. Das physiologische Muster erhöhter Nachtaktivität (ca. 4000 bis 5000 Counts) und niedriger Tagesaktivität (ca. 1000 bis 2000 Counts) blieb bei allen Versuchsgruppen erhalten und wurde somit durch die Imiquimodbehandlung nicht beeinflusst.

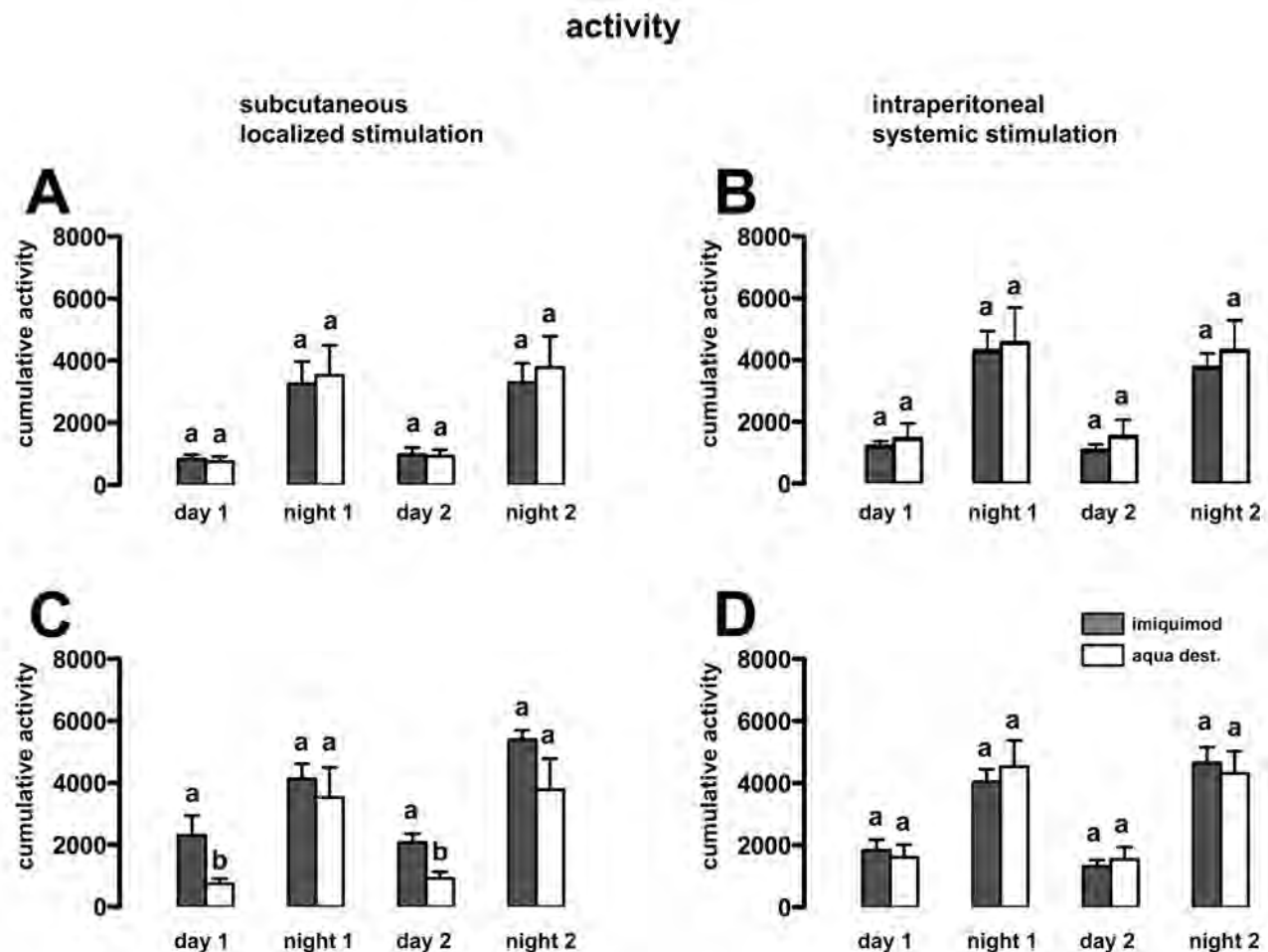


Abb. 18: Kumulative Aktivität nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit Imiquimod im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen im zu vergleichenden Zeitraum an. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis. „Day 1“ / „night 1“ repräsentiert den Injektionstag, „day 2“ / „night 2“ den darauffolgenden Tag.

3.1.1.3 FUTTER- UND WASSERAUFNAHME

Signifikante Unterschiede zwischen der lokal (SC) oder systemisch (IP) mit Imiquimod (5 mg/kg) injizierten, und der jeweiligen Kontrollgruppe ergab die Untersuchung des Fressverhaltens am Injektionstag (Abb. 18). Die p- und F-Werte der jeweils signifikant unterschiedlichen Gruppen sind in Tab. 10 zusammengefasst. Da die während der Hellphase aufgenommene Futter- und Wassermenge sehr gering waren, wurde der Verbrauch über 24 Stunden dargestellt. Am Injektionstag zeigten die mit Imiquimod (5 mg/kg) behandelten Tiere eine partielle Anorexie und die Futteraufnahme fiel signifikant gegenüber den Kontrollgruppen ab. Am folgenden Tagen nahmen die Tiere aller Gruppen wieder ähnliche Futtermengen von mindestens 17,1 g bis höchstens 18,9 g auf.

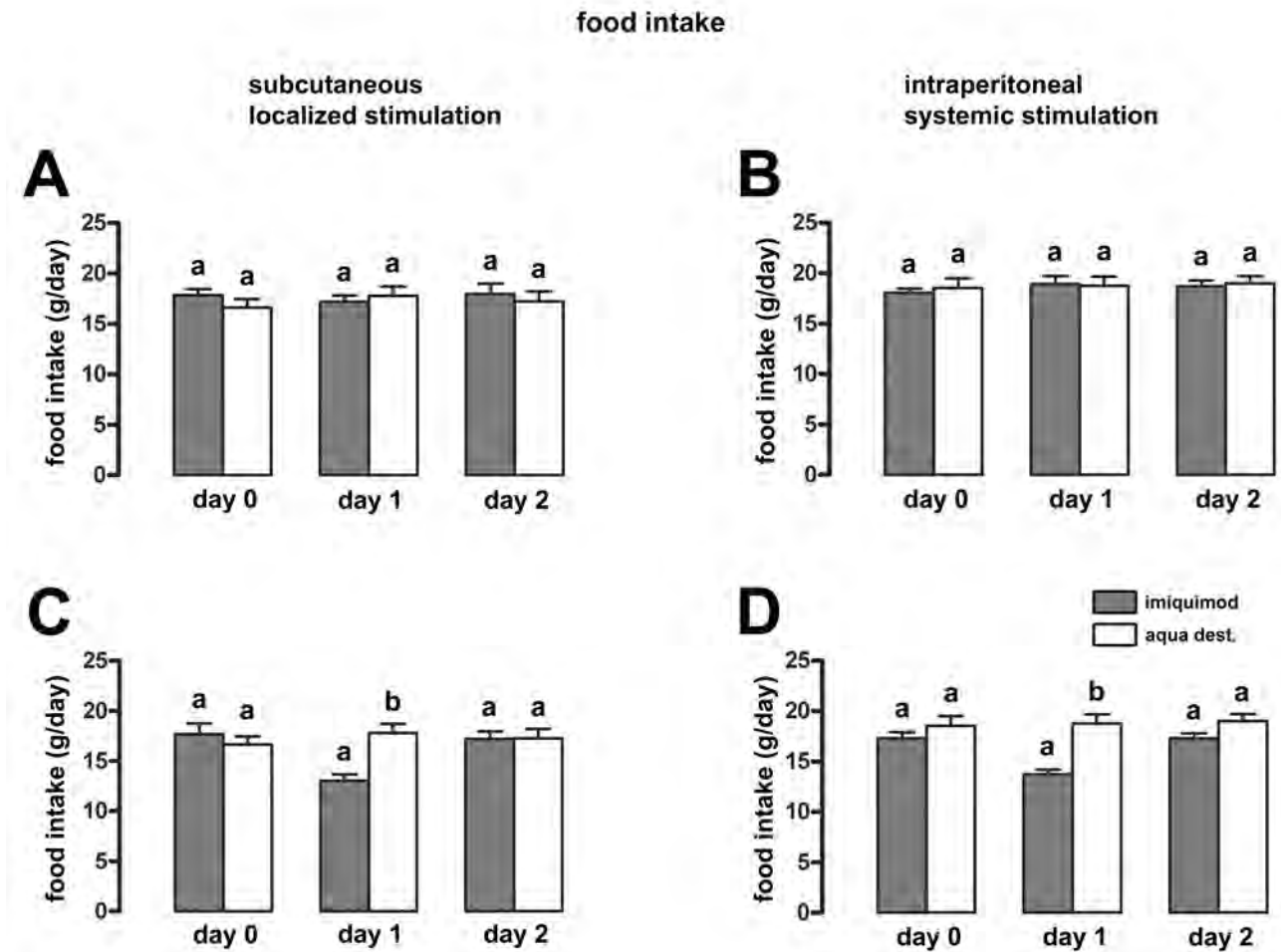


Abb. 19: Futteraufnahme nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit Imiquimod im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen am zu vergleichenden Tag an. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis. „day 1“ repräsentiert die ersten 24 Stunden post injectionem, „day 0“ die 24 Stunden vor der Injektion.

Gruppe	Futteraufnahme (g / 24h)	F-Wert	p-Wert
Imiquimod, SC, 5 mg/kg, day 1	$13,0 \pm 0,6$	22,36	0,0004
Aqua ad injectionem, SC, day 1	$17,8 \pm 0,9$		
Imiquimod, IP, 5 mg/kg, day 1	$13,7 \pm 0,4$	20,25	0,0009
Aqua ad injectionem, IP, day 1	$18,7 \pm 0,9$		

Tab. 10: Signifikante Unterschiede in der Futteraufnahme nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) am Tag der Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Wasseraufnahme wurde durch die Behandlung mit Imiquimod nicht signifikant beeinflusst (Abb. 20). Die Menge des aufgenommenen Trinkwassers war bei allen Gruppen während des kompletten Versuchsablaufs annähernd gleich. An keinem der Tage zeigten sich signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe.

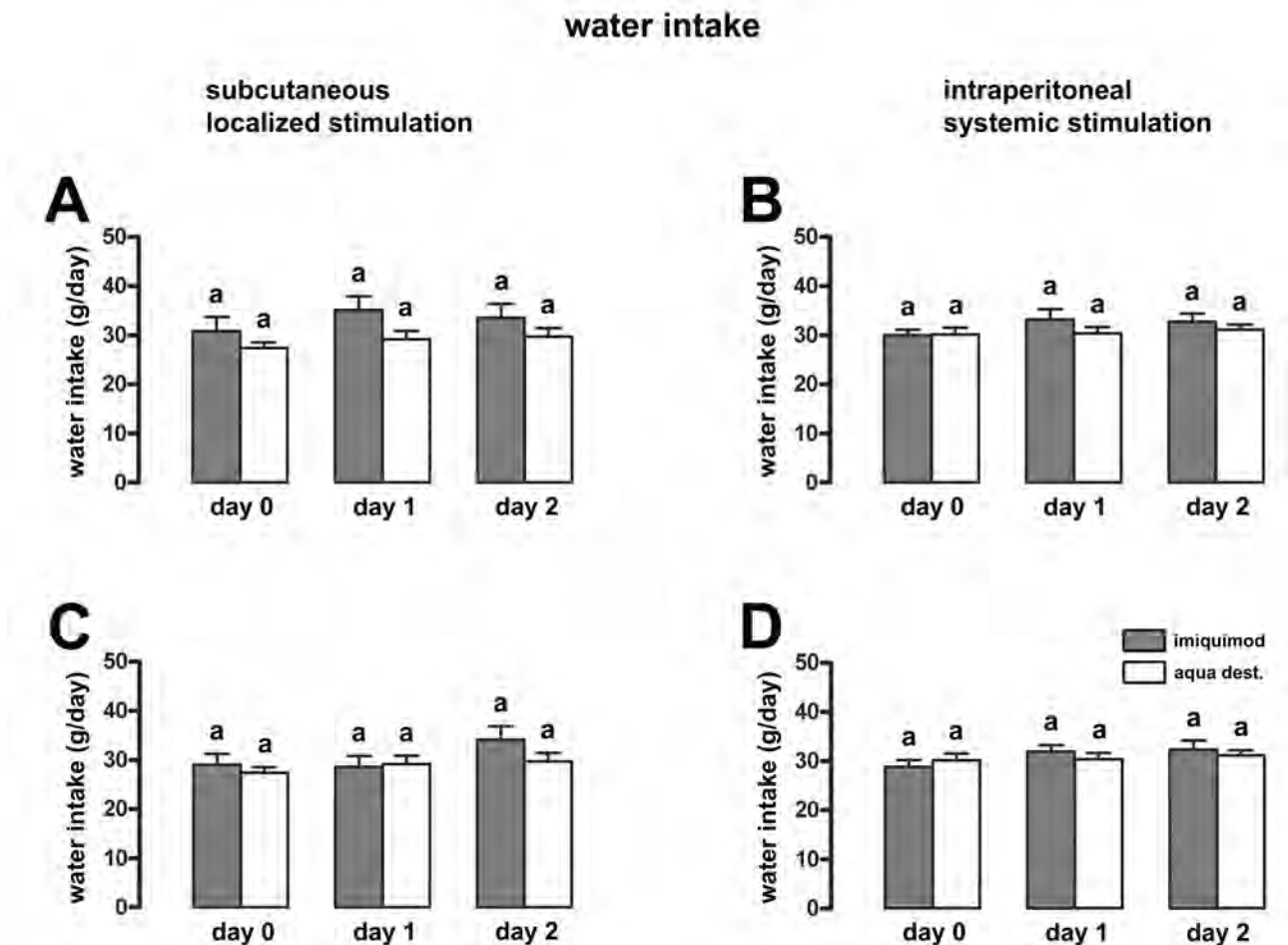


Abb. 20: Wasseraufnahme nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit Imiquimod im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei keiner der mit Imiquimod stimulierten Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe, was durch gleiche Buchstaben über den Säulen der jeweils zu vergleichenden Gruppen angezeigt wird. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis. „day 1“ repräsentiert die ersten 24 Stunden post injectionem, „day 0“ die 24 Stunden vor der Injektion.

3.1.1.4 KÖRPERGEWICHT

Die herabgesetzte Futteraufnahme am Injektionstag der mit der hohen (5 mg/kg) Imiquimod Dosis behandelten Ratten spiegelte sich in einer Differenz der Körpergewichtsentwicklung beider Versuchsgruppen am nächsten Tag (Abb. 21). Die Tiere der lokal (SC) sti-

mulierten Gruppe verloren sogar etwas Gewicht, während die Zunahme der systemisch (IP) stimulierten Gruppe signifikant zurückging.

Die Tiere der Kontrollgruppen und die mit der niedrigen (1 mg/kg) Imiquimod Dosis behandelten nahmen Gewicht zu. Tab. 11 zeigt die Körpergewichtsänderung der jeweiligen Gruppen am Tag nach der Injektion.

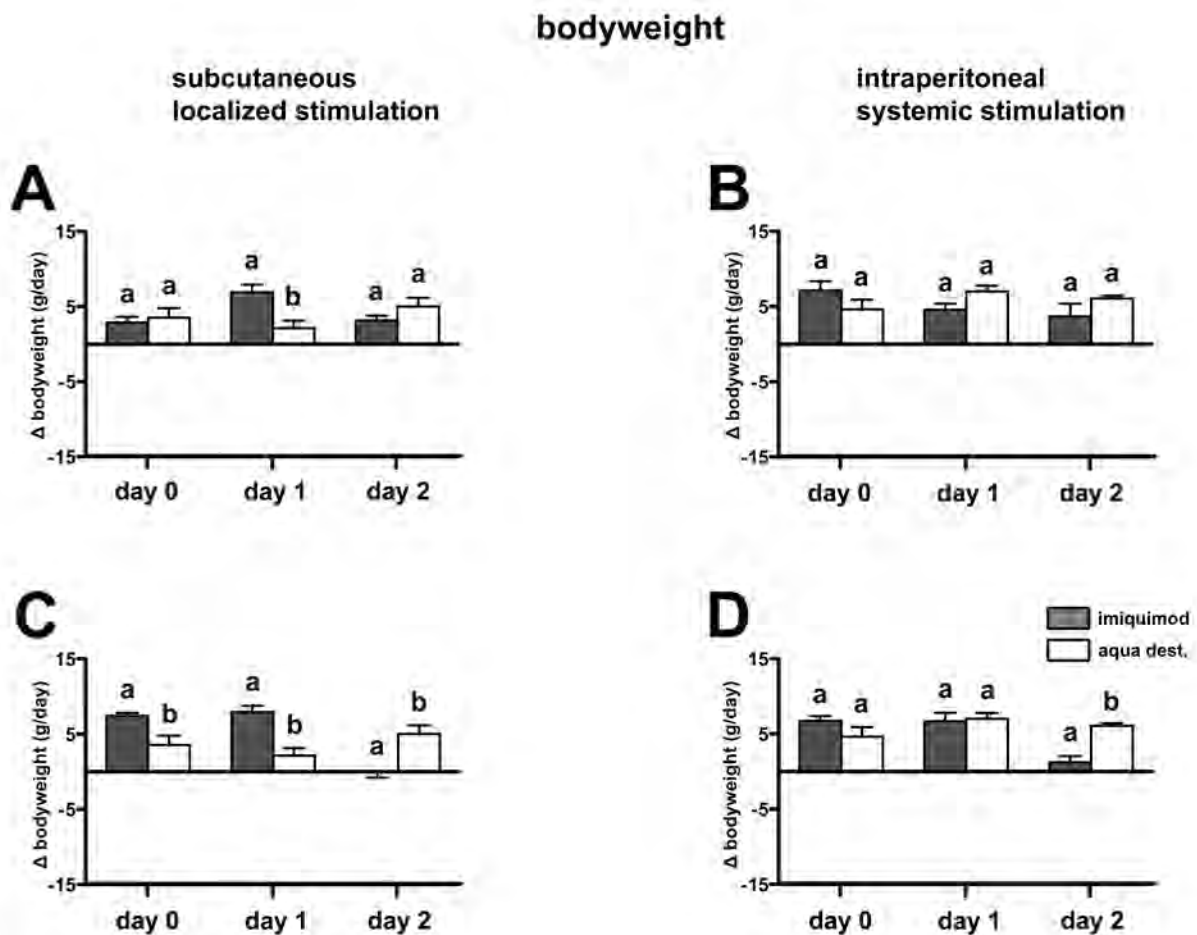


Abb. 21: Körpergewichtsänderung nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit Imiquimod im Vergleich zur Kontrollgruppe. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p = <0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen am zu vergleichenden Tag an. „day 0“ repräsentiert den Wert 24 h vor Injektion, an „day 1“ erfolgte die Injektion und „day 2“ repräsentiert die ersten 24 Stunden post injectionem.

Gruppe	Δ Körpergewicht (g)	F-Wert	p-Wert
<i>Imiquimod, SC, 5 mg/kg, day 2</i>	$-0,01 \pm 0,79$	13,29	0,0039
<i>Aqua ad injectionem, SC, day 2</i>	$5,00 \pm 1,1$		
<i>Imiquimod, IP, 5 mg/kg, day 2</i>	$1,22 \pm 0,82$	28,53	0,0001
<i>Aqua ad injectionem, IP, day 2</i>	$6,06 \pm 0,36$		

Tab. 11: Signifikante Körpergewichtsänderungen am Tag nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.

3.1.2 MOLEKULARE UNTERSUCHUNGEN

Aufgrund der telemetrisch erhobenen Befunde zur Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome wurden die nachfolgenden molekularen Untersuchungen mit Probenmaterial aus Ratten erhoben, die mit der hohen Dosis (5 mg/kg) Imiquimod stimuliert wurden, und mit entsprechenden Kontrollgruppen verglichen. Lediglich bei der Erfassung biologisch aktiver Zytokine wurden nochmals beide Dosierungen getestet.

3.1.2.1 EXPRESSIONSMUSTER VON INTERFERONEN IN LEBER UND MILZ AUF mRNA-EBENE MITTELS RT-PCR

Da die Aktivierung von TLR 7 mit Typ I-Interferonen gekoppelt zu sein scheint (Blasius & Beutler, 2010; Diebold et al., 2004), verglichen wir zunächst die Kapazität von lokaler (SC) und systemischer (IP) Injektion von Imiquimod (5 mg/kg) zur Induktion einer Expression von Interferonen in Leber und Milz.

LEBER (ABB. 22)

Signifikante Unterschiede für IFN α zeigten sich sechs Stunden nach systemischer (IP) Stimulation, wobei die mRNA Expression der stimulierten Gruppe „downreguliert“ war. Der gleiche Effekt zeigte sich nach lokaler (SC) Stimulation, war allerdings nicht signifikant zur Kontrollgruppe.

Die IFN β Expression stellte sich sowohl zwei als auch sechs Stunden nach systemischer (IP) Stimulation signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrollgruppe dar. Auch hier war die mRNA Expression der stimulierten Tiere „downreguliert“.

Ein massiver, signifikanter Anstieg der IFN γ Expression zeigte sich bei beiden mit Imiquimod stimulierten Gruppen zu beiden untersuchten Zeitpunkten, wobei das Maximum, ein mehr als 5.000-facher Anstieg der IFN γ Expression, jeweils nach zwei Stunden zu detektieren war.

MILZ (ABB. 23)

In der Milz zeigte sich ein signifikanter, ca. 100-facher, Anstieg der IFN α Expression zwei Stunden nach lokaler (SC) Injektion von Imiquimod. Zum sechs Stunden Zeitpunkt stellte sich die stimulierte Gruppe bezüglich der IFN α Expression jedoch signifikant „downreguliert“ gegenüber der Kontrollgruppe dar. Die verminderte Expression beim zweiten gemessenen Zeitpunkt könnte Ergebnis eines negativen regulatorischen Feedbacks sein.

Die IFN β Expression stieg ebenfalls zwei Stunden nach lokaler (SC) Injektion von Imiquimod signifikant, um das ca. 250-fache, an und unterschied sich nach sechs Stunden nicht mehr von der Kontrollgruppe. Systemische (IP) Stimulation mit Imiquimod führte dagegen zu keiner gesteigerten Expression von IFN α und IFN β .

Die relative Expression von IFN γ entsprach dem bereits in der Leber gemessenen Muster. Der Anstieg der Expression war mit einem mehr als 10.000-fachen (SC) bzw. 7.500-fachen (IP) Anstieg noch stärker als in der Leber. Der Höhepunkt der IFN γ Expression war in der Milz nach zwei Stunden, und nach lokaler (SC) Stimulation etwas stärker als nach systemischer (IP) und nach sechs Stunden immer noch signifikant (ca. 2.000-fach) gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die postulierte Kapazität einer TLR 7 Aktivierung zur Stimulation einer IFN-Expression sich besonders in der Milz und stärker nach lokaler (SC) Injektion manifestierte. Überraschend in diesem Zusammenhang war, dass sich dieser Effekt extrem stark auf IFN γ konzentrierte und die Expression der Typ I-Interferone vergleichsweise moderat ausfiel.

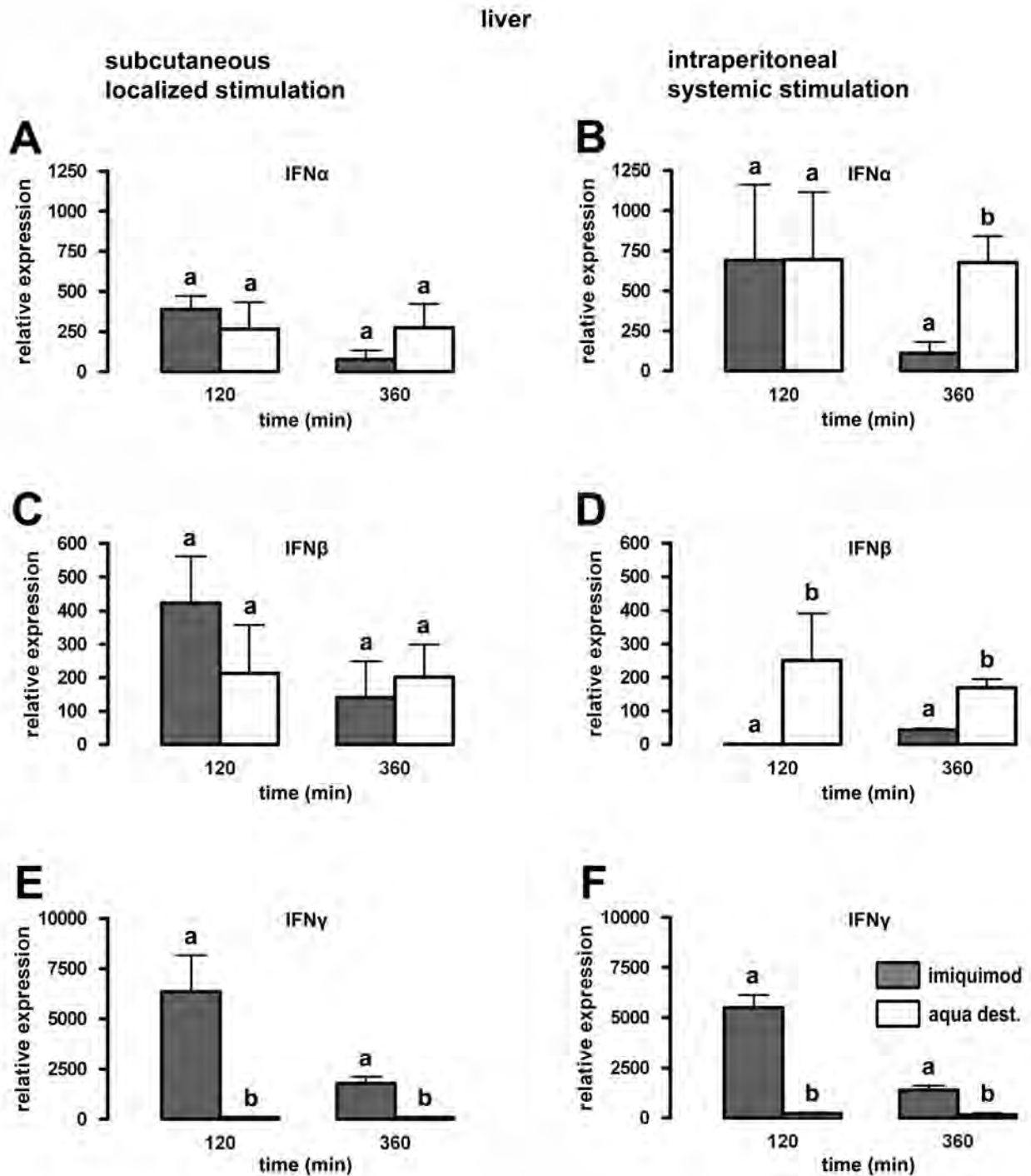


Abb. 22: Relative Interferonexpression in der Leber nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

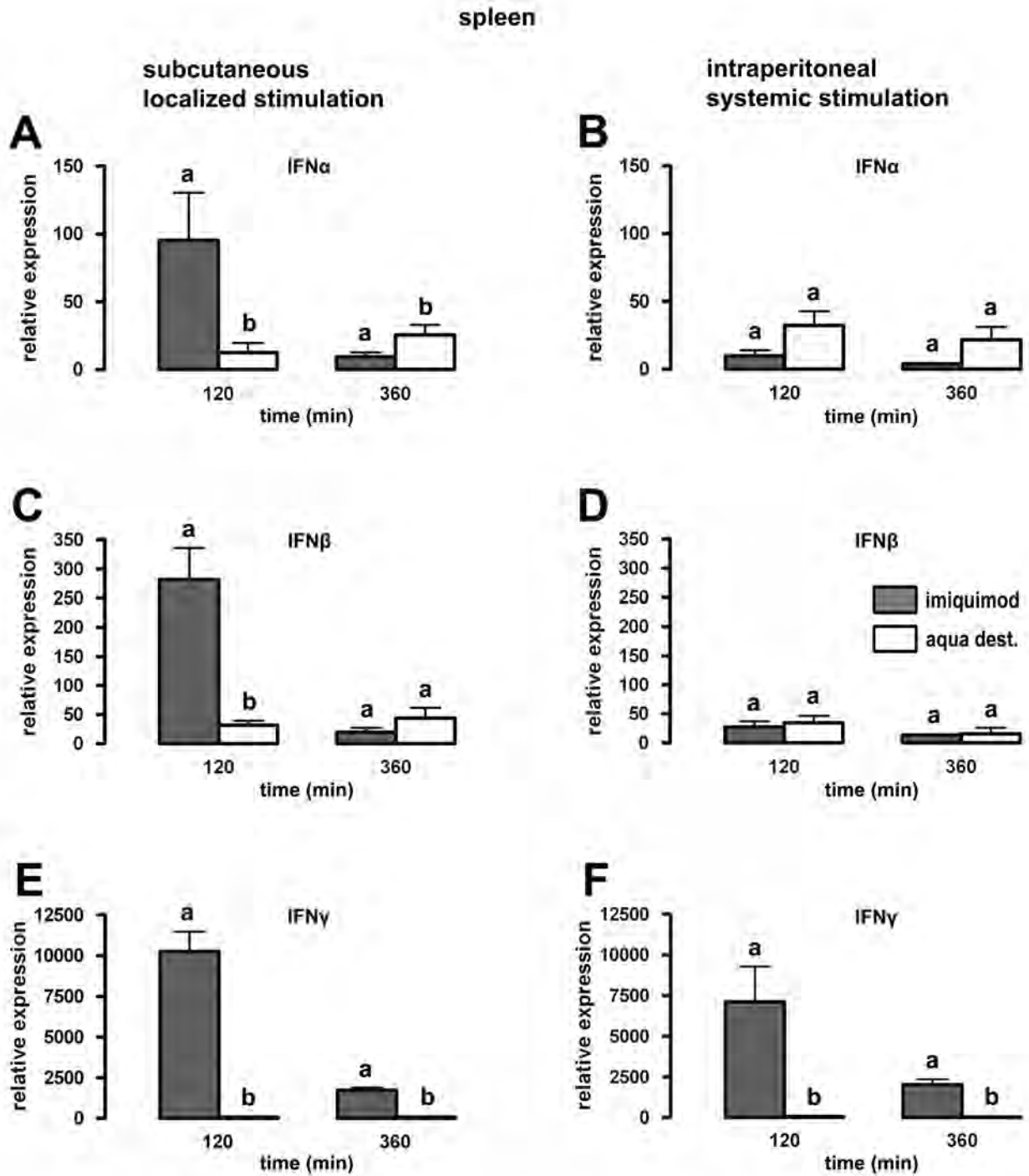


Abb. 23: Relative Interferonexpression in der Milz nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

3.1.2.2 ZYTOKIN GEHALT IN PLASMA- UND LAVAGEPROBEN

Da durch die Gabe von Imiquimod in ein lokales subkutanes Kompartiment („airpouch“), zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome induziert wurden und in Leber und Milz eine erhöhte IFN Expression zu detektieren war, sollten nun Hinweise für die Mechanismen der Signalübertragung vom subkutanen Entzündungsort zum Gehirn gewonnen werden. Weiter wurde untersucht ob, Entzündungsmediatoren im Blut nach systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod potentiell eine Rolle bei der Entstehung der Krankheitssymptome spielten.

Gemessen wurden die Entzündungsmediatoren IL-6 und TNF α sowie IFN γ in der Lavage des Entzündungsareals und im Blutplasma. Diesen endogenen Mediatoren wird speziell bei der Fieberentstehung (IL-6 und TNF α) und bei der Abwehr viraler Infektionen (IFN γ) besondere Bedeutung zugeschrieben. Es wurde ermittelt, in welchem Ausmaß diese Zytokine nach Stimulation am Entzündungsort gebildet wurden (Lavage) und ob und in welchem Umfang ein Erscheinen dieser Substanzen im Blutkreislauf nachzuweisen war.

IL-6 (ABB. 24)

Nach Stimulation mit der niedrigen (1 mg/kg) Imiquimod Dosis kam es lediglich in der aus dem subkutanen Kompartiment („airpouch“) gewonnenen Lavage zu einem signifikanten Anstieg von IL-6. Im Plasma stiegen die Werte weder nach systemischer (IP) noch nach subkutaner (SC) Stimulation signifikant gegenüber denen der Kontrollgruppe an.

Nach systemischer (IP) Stimulation mit der hohen (5 mg/kg) Imiquimod Dosis stiegen die IL-6 Werte im Plasma nach zwei und sechs Stunden signifikant gegenüber denen der Kontrollgruppe an. In der Lavageflüssigkeit der subkutan (SC) stimulierten Gruppe war zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe messbar. Im Blutplasma war lediglich nach sechs Stunden ein signifikant erhöhter IL-6 Gehalt feststellbar.

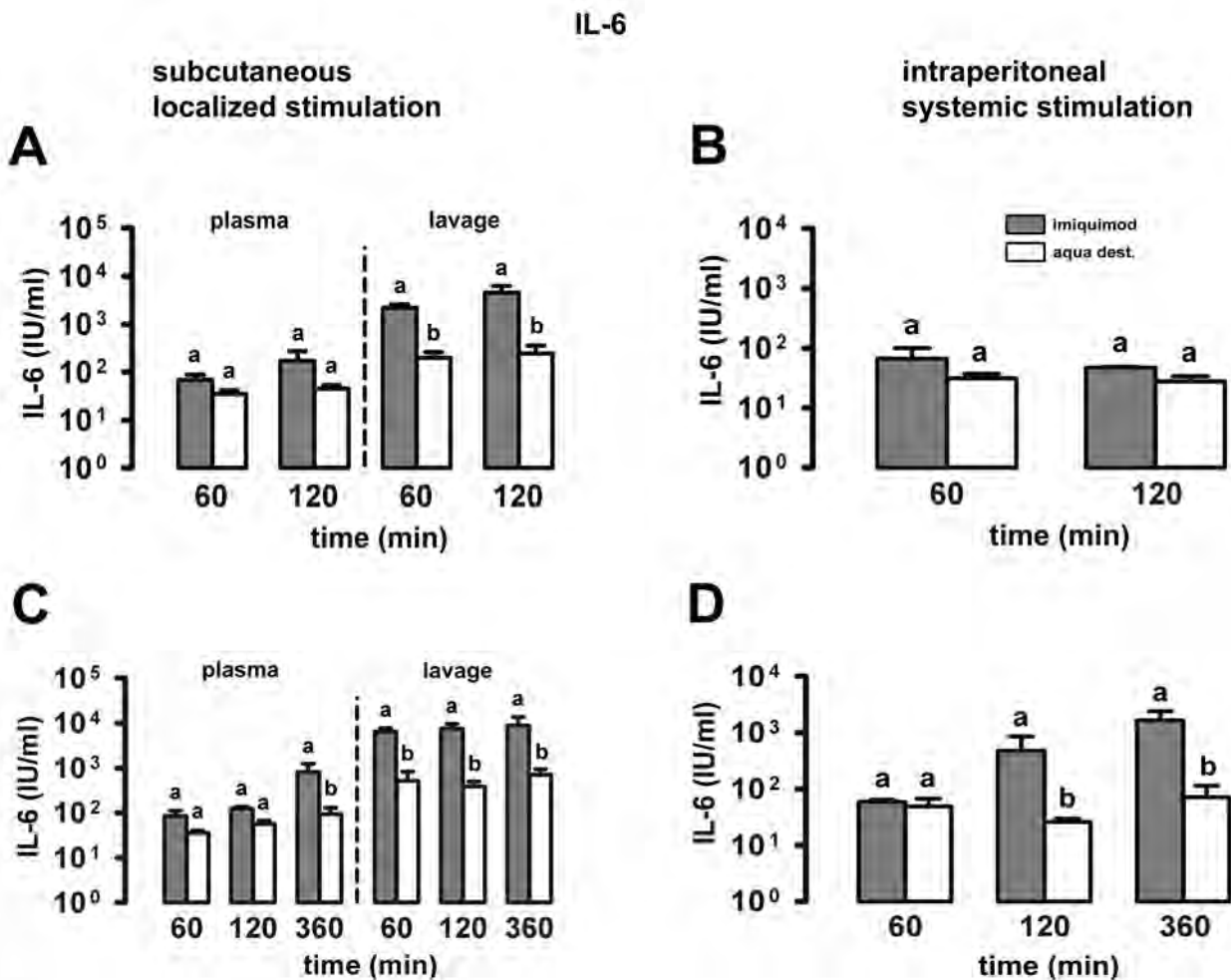


Abb. 24: IL-6 Gehalt in Blutplasma und Lavageflüssigkeit nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit Imiquimod im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis. Aufgrund der hohen Streuung der Werte wurde die IL-6 Konzentration in allen Teilabbildungen logarithmisch dargestellt.

TNF α (ABB. 25)

Bei den lokal (SC) und systemisch (IP) mit der niedrigen (1 mg/kg) Imiquimod Dosis stimulierten Gruppen war zu keinem der betrachteten Zeitpunkte TNF α im Plasma nachweisbar. Bei den lokal (SC) und systemisch (IP) mit der hohen Imiquimod Dosis (5 mg/kg) stimulierten Gruppen war im Gegensatz dazu nach einer und zwei Stunden ein moderater TNF α Anstieg im Plasma messbar. Nach sechs Stunden war im Plasma kein TNF α mehr detektierbar.

Bei den aus dem „airpouch“ gewonnenen Lavageproben war bei beiden mit Imiquimod (1 mg/kg oder 5 mg/kg) stimulierten Gruppen zu allen betrachteten Zeitpunkten ein moderater Anstieg von TNF α in der Lavageflüssigkeit zu beobachten, der nach einer und

zwei Stunden signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrollgruppe war. Bei den Kontrollgruppen war nach einer und zwei Stunden eine basale TNF α Konzentration in der Lavageflüssigkeit zu detektieren.

Im Plasma der mit der hohen Dosis (5 mg/kg) lokal (SC) behandelten Tiere kam es nach ein und zwei Stunden zum Übertritt moderater Mengen an lokal im subkutanen Entzündungsareal gebildeten biologisch aktivem TNF α in die Blutbahn. Daraus lässt sich ableiten, dass TNF α wie auch IL-6 nach der Stimulation mit Imiquimod dosisabhängig als humorales Signal, zur Auslösung zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome, fungiert haben könnte.

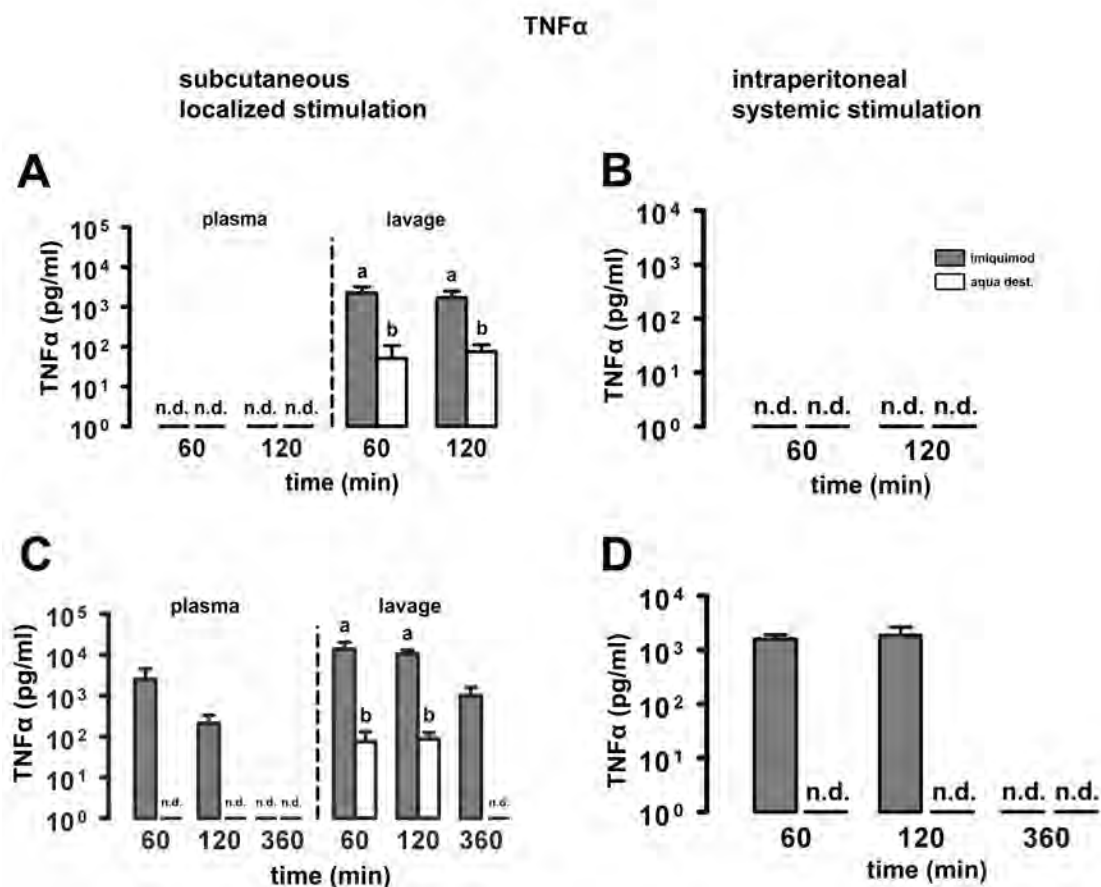


Abb. 25: TNF α Gehalt in Blutplasma und Lavageflüssigkeit nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit Imiquimod im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis. Die Abkürzung n.d. steht für „nicht detektierbar“. Aufgrund der hohen Streuung der Werte wurde die TNF α Konzentration in allen Teilabbildungen logarithmisch dargestellt.

IFN γ (ABB. 26)

Nach der lokalen (SC) und systemischen (IP) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) kam es nach zwei und sechs Stunden im Plasma beider Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des immunreaktiven IFN γ Gehalts, welcher jedoch zum sechs Stunden Zeitpunkt deutlich stärker ausgeprägt war als nach zwei Stunden. Auch in der Lavageflüssigkeit der lokal (SC) stimulierten Gruppe stieg der IFN γ Gehalt nach sechs Stunden signifikant an.

Der erhöhten Expression von IFN γ auf mRNA-Ebene mit einem Maximum nach zwei Stunden, folgte somit mit entsprechender Verzögerung auch ein deutlicher Anstieg an peripher gebildetem IFN γ auf Proteinebene, das somit ebenfalls als potentielles humorales Signal zur Entstehung der durch Imiquimod induzierten, moderaten Krankheitssymptome anzusehen ist.

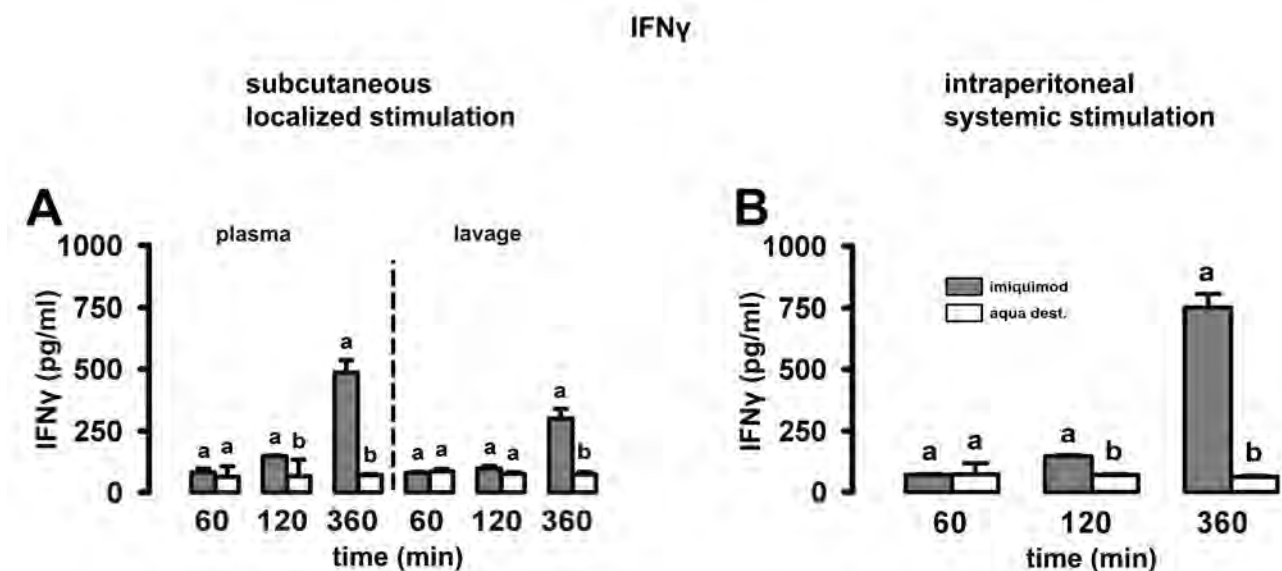


Abb. 26: IFN γ Gehalt in Blutplasma und Lavageflüssigkeit nach lokaler (A) und systemischer (B) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

3.1.2.3 EXPRESSIONSMUSTER RELEVANTER INFLAMMATORISCHER SIGNALMOLEKÜLE IM HYPOTHALAMUS AUF mRNA-EBENE MITTELS RT-PCR

Die durch inflammatorische Signale induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die nachgeschaltete Expression relevanter Zielgene, besonders Zytokine und Prostaglandine, im Hypothalamus wird als essenziell für die Entstehung des Gesamtspektrums zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome angesehen (Dantzer et al., 2008). Im Folgenden wurde daher mittels „real-time PCR“ die hypothalamische Expression einer breiten

Palette potentieller endogener Mediatoren des zentralnervös kontrollierten Krankheitsgeschehens untersucht. Dazu wurde das in Kap. 2.3.2 gewonnene Gewebe verwendet und nach dem in Kap. 2.3.3.3 beschriebenen Protokoll weiter bearbeitet.

Betrachtet wurden jeweils der zwei und sechs Stunden Zeitpunkt nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe, da hier nach Betrachtung der in der Telemetrie und Plasmaprobenanalyse gewonnenen Daten die erfolversprechendsten Ergebnisse zu erwarten waren.

TRANSKRIPTIONSFAKTOREN (ABB. 27):

Die wichtigsten im Rahmen eines Entzündungsgeschehens auch im Gehirn aktivierten Transkriptionsfaktoren sind NF- κ B (Nadjar et al., 2003), STAT3 (Harre et al., 2003; Christoph Rummel et al., 2005) und NF-IL6 (Damm et al., 2011). I κ B und SOCS3 sind negative Regulatoren der Transkriptionsfaktoren NF- κ B bzw. STAT3 und gelten als Expressionsmarker für deren Aktivierung; eine gesteigerte Expression von NF-IL6 kann dagegen direkt erfasst werden. Die Analyse der Expressionsprofile der drei Transkriptionsfaktoren nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod ist in Abb. 27 zusammengefasst.

Signifikante Unterschiede der I κ B Expression zeigten sich zwei Stunden nach lokaler (SC) und sechs Stunden nach systemischer (IP) Injektion von Imiquimod. Insgesamt stellten sich die mit dem TLR 7 Agonisten stimulierten Gruppen mit einer etwas höheren Expression, verglichen mit den Kontrollgruppen dar. Die SOCS3 Expression war zu beiden Zeitpunkten sowohl nach lokaler (SC), als auch nach systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod signifikant im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe erhöht. Lediglich sechs Stunden nach lokaler (SC) Injektion von Imiquimod kam es zu einer signifikanten Erhöhung von NF-IL6 im Hypothalamus auf mRNA-Ebene.

ZYTOKINE (ABB. 28 - ABB. 29):

Im Gegensatz zu den peripheren Organen Leber und Milz kam es im Hypothalamus zu keiner signifikanten Erhöhung der mRNA Expression der untersuchten Interferone. Die IFN γ Expression zeigte tendenziell ein ähnliches Muster wie in Leber und Milz, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen.

Sechs Stunden nach Imiquimod Injektion kam es sowohl bei der lokal (SC) als auch bei der systemisch (IP) behandelten Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der mRNA Expression von TNF α und IL-6. Die IL-1 Expression der lokal (SC) mit Imiquimod behandel-

ten Gruppe war sowohl nach zwei, als auch sechs Stunden signifikant erhöht, nicht jedoch bei den systemisch (IP) mit Imiquimod stimulierten Tieren.

SCHLÜSSELENZYME DER PROSTAGLANDINSYNTHESE (ABB. 30):

Zumindest für die Ausbildung einer Fieberreaktion wird die stimulierte Expression der inflammatorisch induzierbaren Formen der Prostaglandinsynthese, COX 2 und mPGES, direkt verantwortlich gemacht (Engblom et al., 2003; Roth et al., 2009; Yamagata et al., 2001). Daher wurde auch die hypothalamische Expression dieser beiden Moleküle nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod untersucht.

Zu einer signifikanten Erhöhung der COX 2 Expression kam es sechs Stunden nach lokaler (SC) und zwei Stunden nach systemischer (IP) Injektion von Imiquimod. Sechs Stunden nach Injektion war die mPGES Expression sowohl bei der lokalen (SC), als auch bei der systemisch (IP), mit dem TLR 7 Agonisten behandelten Gruppe signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht.

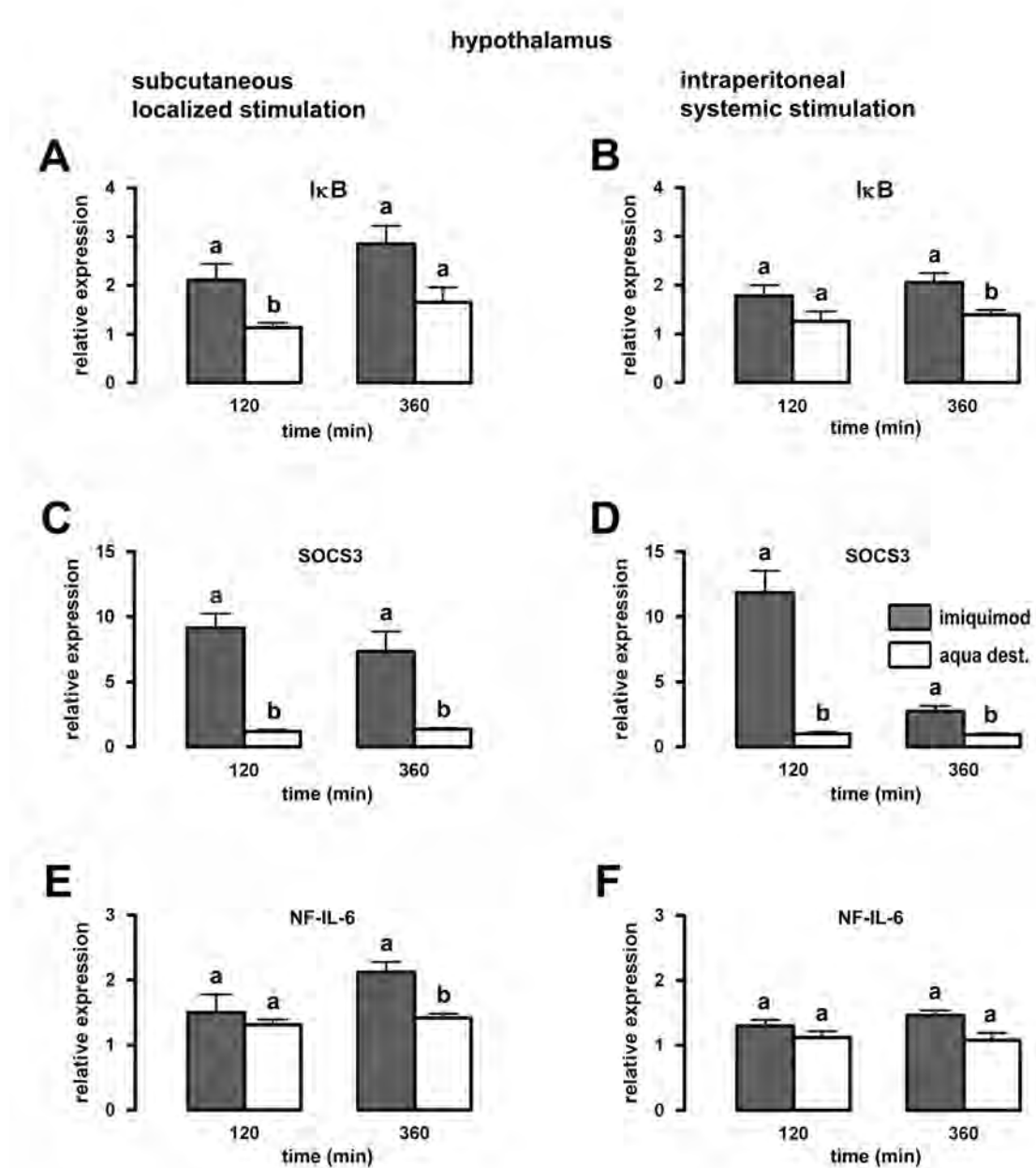


Abb. 27: Relative Expression von Transkriptionsfaktoren im Hypothalamus nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

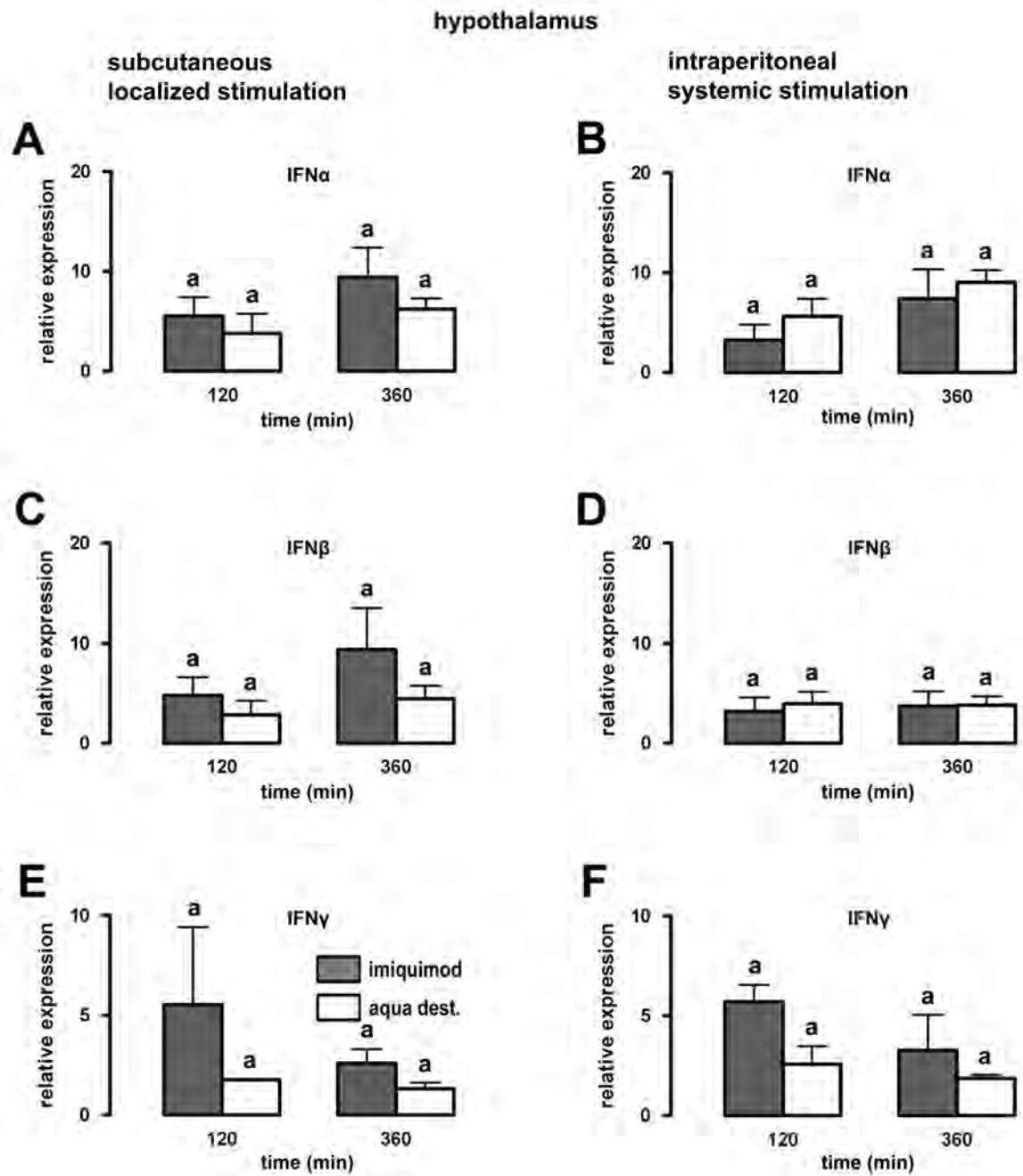


Abb. 28: Relative Interferonexpression in Hypothalamus nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

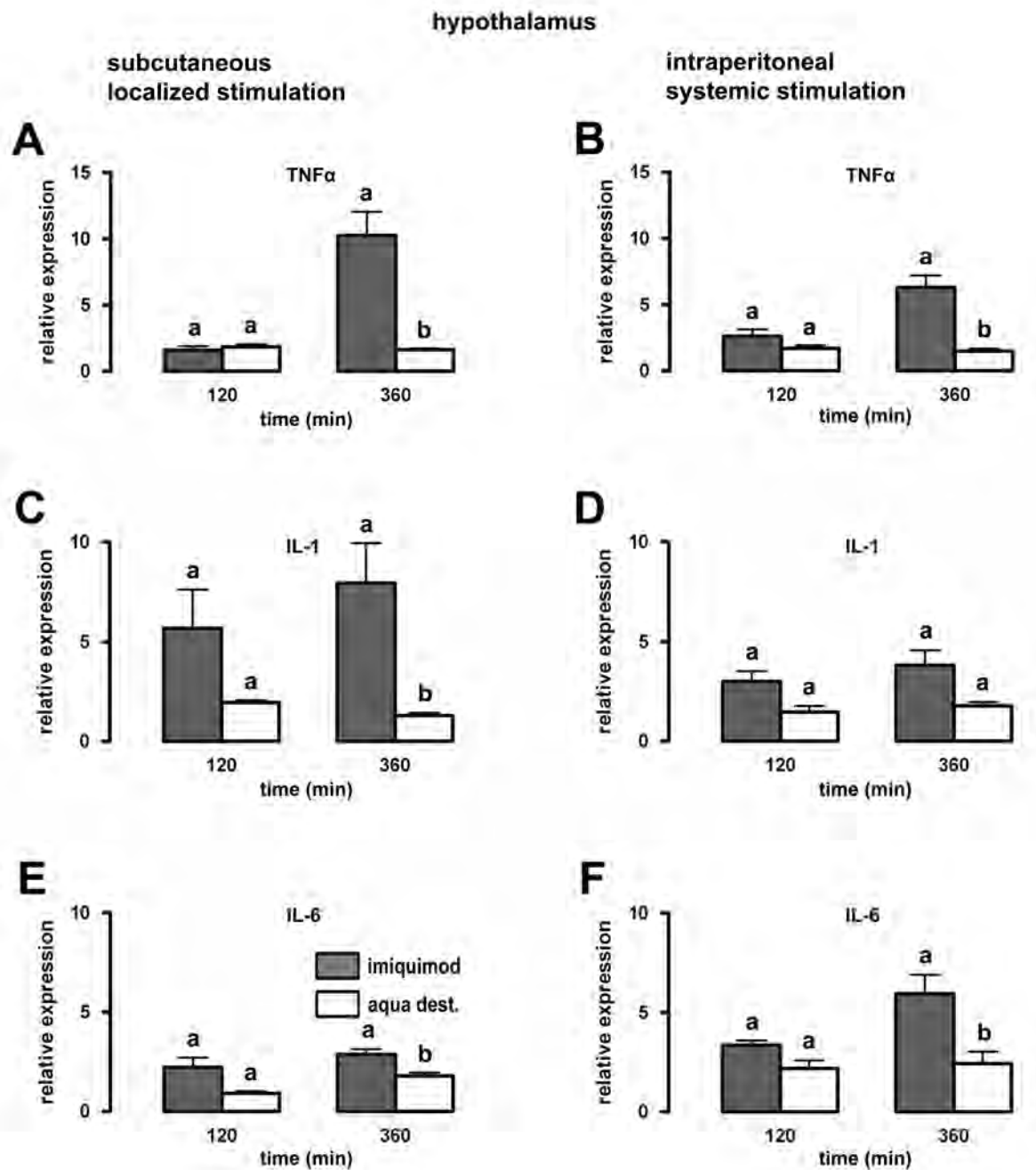


Abb. 29: Relative Zytokinexpression im Hypothalamus nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

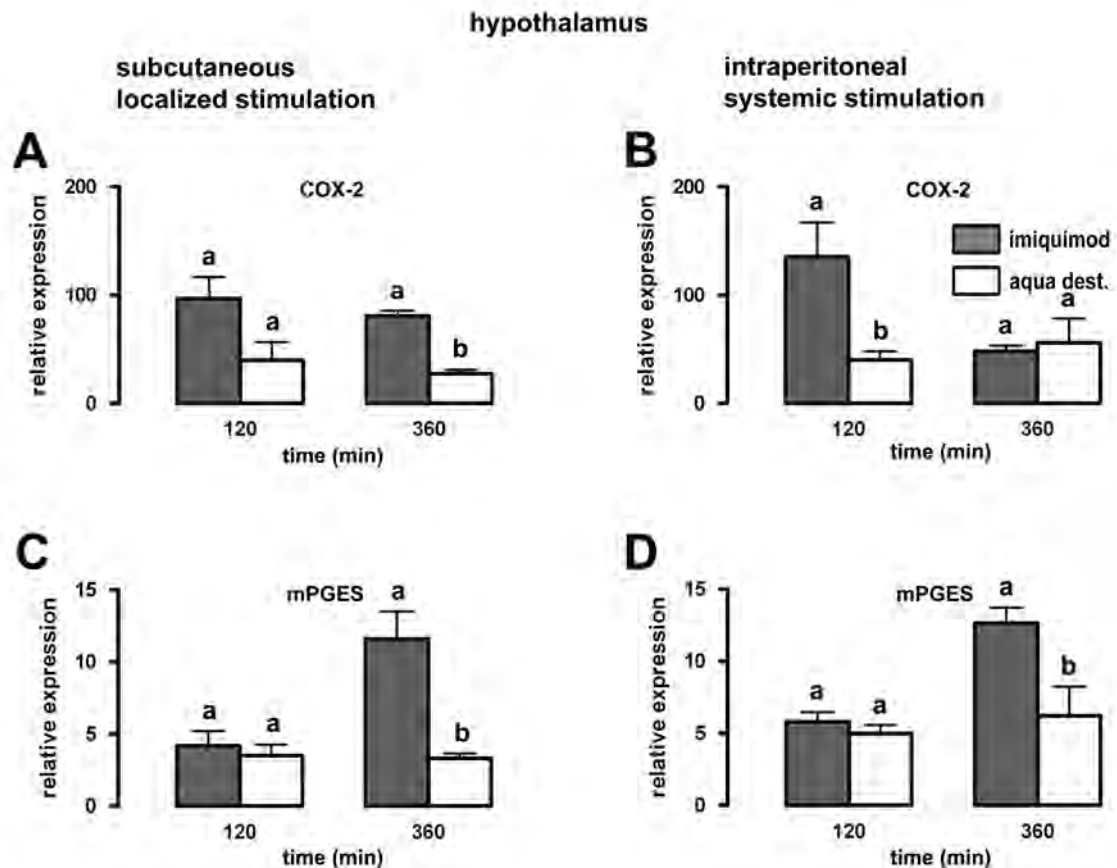


Abb. 30: Relative Expression von Schlüsselenzymen für die Prostaglandinsynthese im Hypothalamus nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

3.1.2.4 EXPRESSIONSMUSTER RELEVANTER INFLAMMATORISCHER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN AUF PROTEINEBENE MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE

Als wichtige Eintrittspforten für inflammatorisch wirksame Moleküle in das Gehirn werden die sensorischen CVO angesehen (siehe Kap. 1.2.1). Hierbei wird dem OVLT eine besondere Bedeutung für die Fieberentstehung (Roth et al., 2004), der AP dagegen bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme und somit eine mögliche Beteiligung an der Anorexie (Fry & Ferguson, 2007), zugeschrieben.

In diesen Strukturen wäre somit eine Aktivierung der drei bei zentralnervös induzierten Krankheitssymptomen relevanten Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT3 und NF-IL6 am ehesten zu vermuten. Eine solche Aktivierung kann auch ohne gesteigerte Genexpression auf mRNA-Ebene erfolgen, da die Transkriptionsfaktoren konstitutiv im Zytoplasma vorlie-

gen und bei entsprechender Stimulation der Zelle in deren Kern akkumulieren, wodurch sie immunhistochemisch nachgewiesen werden können.

Untersucht wurde die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, STAT3 und NF-IL6 in den CVOs, OVLT und AP (Abb. 31), zwei und sechs Stunden nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Injektion von Imiquimod bzw. dem Lösungsmittel Aqua ad injectionem. Als Bildtafel dargestellt sind im Folgenden jeweils die aussagekräftigsten Befunde. Auf die nicht dargestellten Ergebnisse wird im Text eingegangen.

Zur Phänotypisierung der Zellen, welche eine Translokation des Transkriptionsfaktors aus dem Zytoplasma in den Nukleus bzw. im Fall von NF- κ B in die perinukleäre Region zeigten, wurden Bilder durch Überlagerung von Einzelabbildungen erzeugt. So konnte die Kollokalisation von Signal, Zellkern und Zelltyp belegt werden. Da es in dieser Studie nicht primär um die Identifizierung verschiedener aktivierter Zelltypen ging, wurde als repräsentativer Marker für Endothelzellen der vW-Faktor jeweils immunhistochemisch dargestellt.

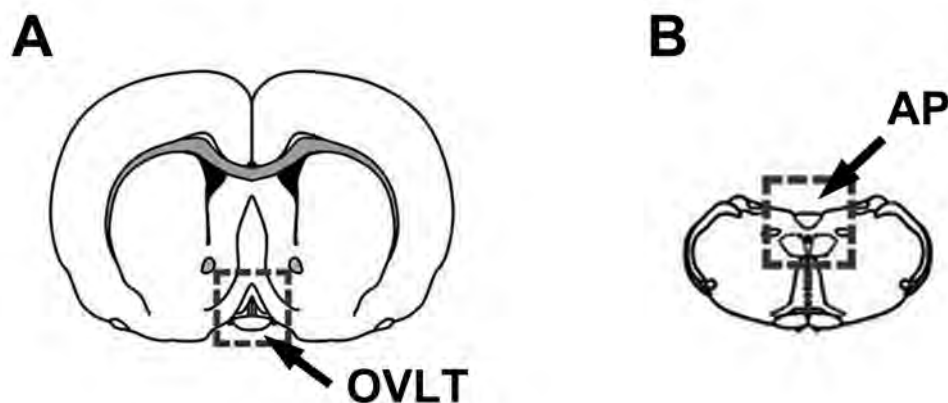


Abb. 31: Coronalschnitt durch ein Rattengehirn auf Höhe der beiden untersuchten CVO, OVLT (A) und AP (B). (Modifiziert nach *The Rat Brain*, Paxinos & Watson, 5th Edition.)

NF-KB (ABB. 32)

Dargestellt ist die NF- κ B Aktivierung von Endothelzellen in Cortex, OVLT und AP nach lokaler (SC) Injektion von Imiquimod (5 mg/kg), verglichen mit der Injektion von Aqua ad injectionem zum zwei Stunden Zeitpunkt.

In allen untersuchten Hirnregionen ließen sich bei den mit Imiquimod behandelten Tieren vereinzelt Endothelzellen nachweisen, die eine nukleäre Translokation oder eine perinukleäre Immunreaktivität von NF- κ B aufwiesen. Ein vergleichbares Bild zeigte sich unabhängig von der gewählten Applikationsart und dem untersuchten Zeitpunkt. Bei den mit der

Kontrolllösung behandelten Tieren waren keine nukleären, aber selten perinukleäre NF- κ B Signale zu detektieren.

STAT3 (ABB. 33)

In OVLT, AP und Cortex der mit Imiquimod (5 mg/kg) stimulierten Tiere waren, unabhängig von der Applikationsart, zum zwei und sechs Stunden Zeitpunkt einzelne Endothelzellen mit STAT3 aktivierten Zellkernen zu detektieren. Aufgrund der geringen Anzahl aktivierter Zellen wurde auf eine quantifizierende Bewertung zwischen lokaler (SC) und systemischer (IP) Injektion verzichtet. Verglichen mit bereits untersuchten TLR Agonisten (Knorr et al., 2010; Rummel et al., 2004; Voss et al., 2007) ist der Effekt von Imiquimod auf die STAT3 Aktivierung im Gehirn als moderat zu bewerten.

Bei den lokal (SC) oder systemisch (IP) mit Aqua ad injectionem behandelten Tieren war in den untersuchten Hirnstrukturen keine nukleäre STAT3 Aktivierung zu detektieren.

NF-IL6 (ABB. 34 - ABB. 35)

Nach Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) zeigte sich bezüglich des Transkriptionsfaktors NF-IL6 eine deutliche Zellaktivierung, die je nach Applikationsart und untersuchtem Zeitpunkt unterschiedlich stark ausgeprägt ausfiel (Abb. 34). Im OVLT aber vor allem in der AP kam es nach lokaler (SC) Applikation zu einer massiven Zunahme NF-IL6 positiver Zellkerne, die sich bereits nach zwei Stunden zeigte und nach sechs Stunden sehr massiv darstellte. Die gleiche Beobachtung ließ sich nach systemischer (IP) Applikation von Imiquimod (5 mg/kg) machen, die Anzahl NF-IL6 positiver Zellen war aber im Vergleich zu den lokal (SC) behandelten Tieren vor allem in der AP geringer.

In Abb. 35 ist die Kolokalisation von nukleärem NF-IL6 und dem endothelialen Marker vWF in Cortex, OVLT und AP sechs Stunden nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist auch hier die stärkere Zellaktivierung nach lokaler (SC) Applikation.

Die Anwesenheit nukleärer NF-IL6 Signale auch in zahlreichen vWF-negativen Zellen zeigt, dass dieser Transkriptionsfaktor auch in anderen Zelltypen außer dem Endothel aktiviert wird. Diese NF-IL6 positiven Zelltypen wurden nach Stimulation mit dem TLR 4 Agonisten LPS im Rahmen einer anderen Studie identifiziert (Damm et al., 2011).

NF- κ B

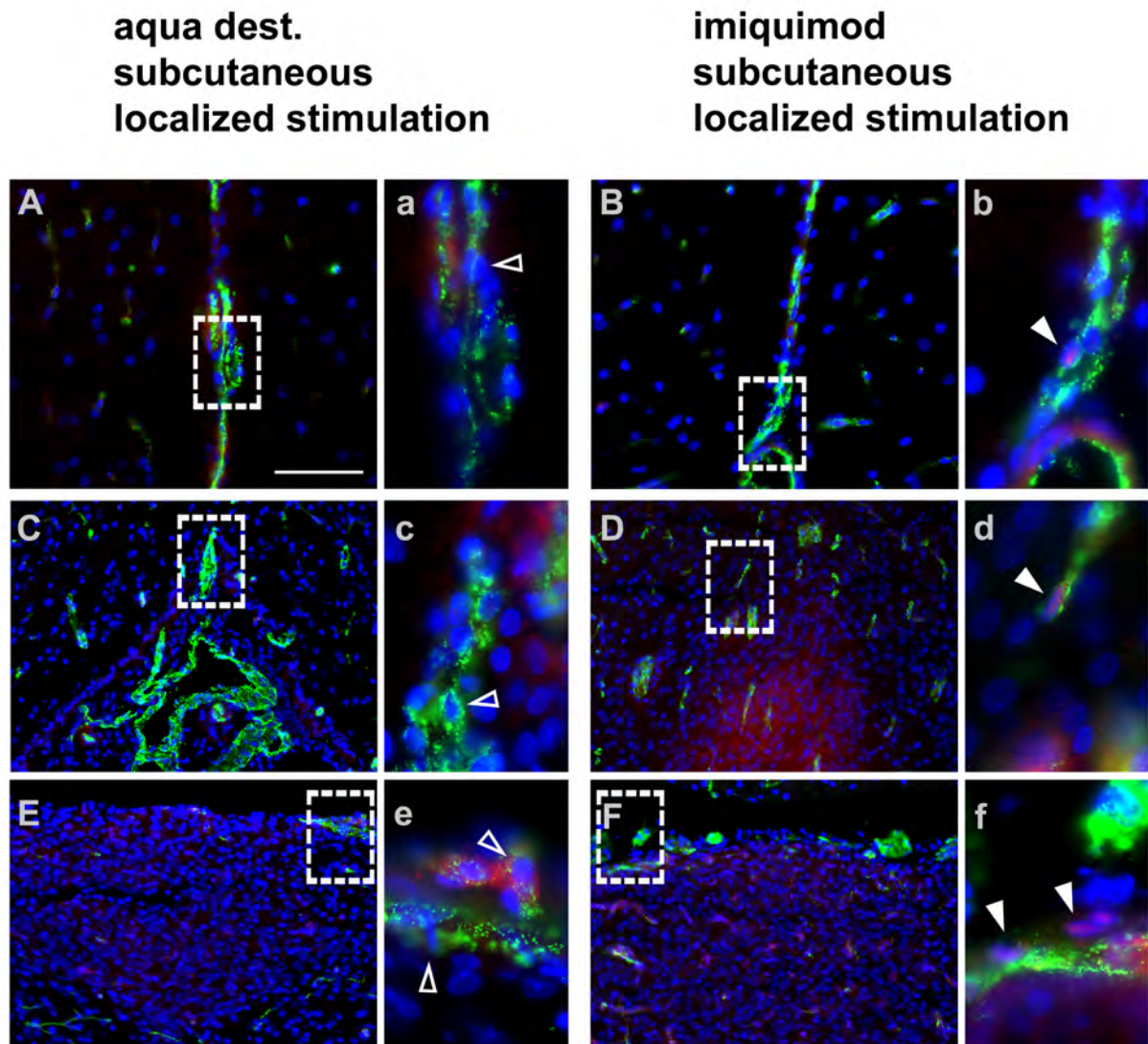


Abb. 32: (Peri-)Nukleäre Immunreaktivität von NF- κ B in Cortex (A,B), OVLT (C,D) und AP (E,F) zwei Stunden nach lokaler (SC) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Aqua ad injectionem. Die Kontrollgruppe zeigte keine nukleäre jedoch selten eine perinukleäre NF- κ B Akkumulation. Die Teilabbildungen a - f sind stärker vergrößerte Fotografien der gekennzeichneten Areale aus A - F. Der Eichbalken in A entspricht in A und B 50 μ m, in C - F 100 μ m und in a - f 20 μ m. Ausgefüllte Pfeilköpfe weisen auf NF- κ B positive, offene Pfeilköpfe auf NF- κ B negative Endothelzellen. Farbkomponenten: mit DAPI angefärbte Zellkerne (blau), NF- κ B Signale (rot), Zellmarker für Endothelzellen „von-Willebrand-Faktor“ (grün).

STAT3

aqua dest.
subcutaneous
localized stimulation

imiquimod
subcutaneous
localized stimulation

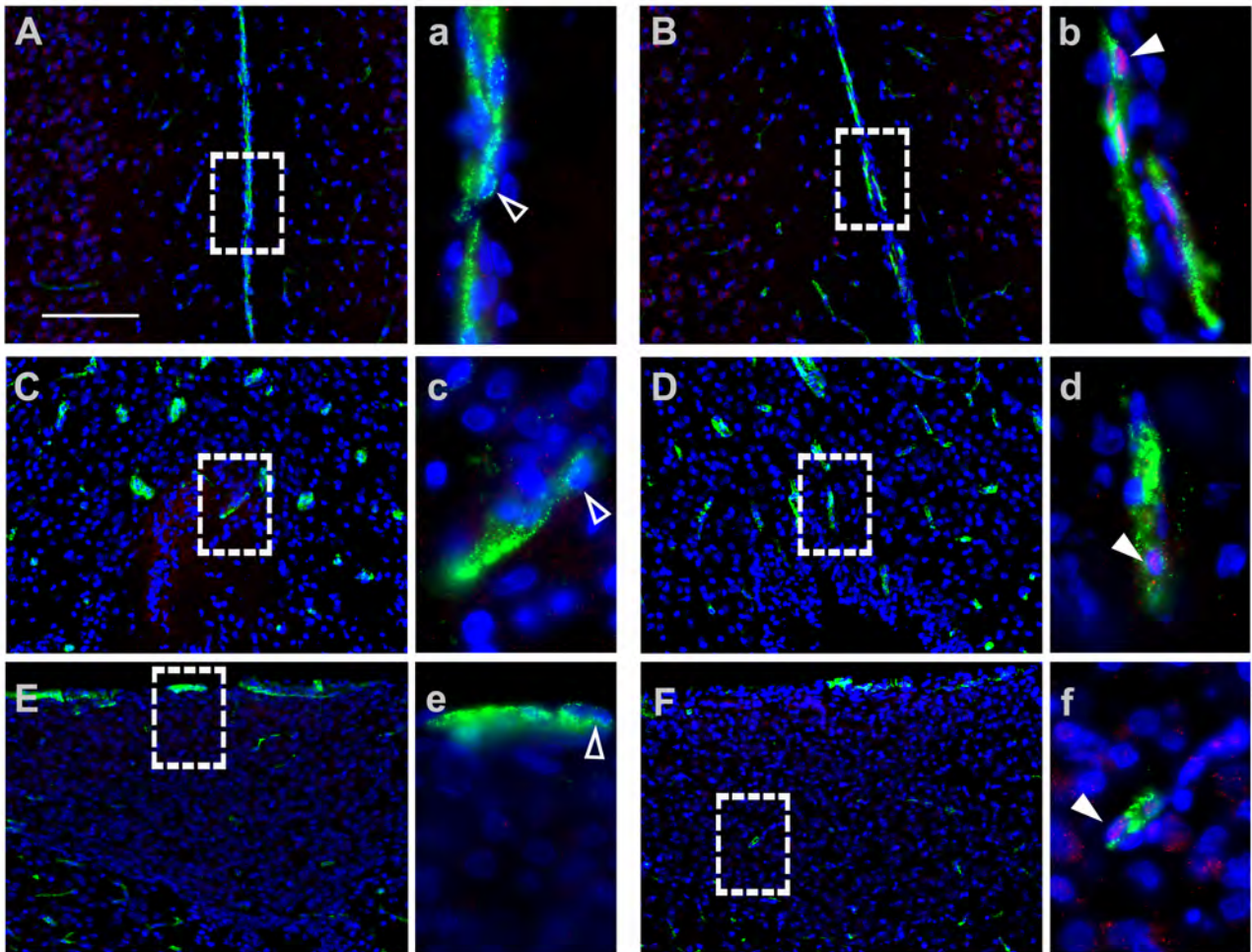


Abb. 33: Nukleäre Immunreaktivität von STAT3 in Cortex (A,B), OVLT (C,D) und AP (E,F) zwei Stunden nach lokaler (SC) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Aqua ad injectionem. Die Kontrollgruppe zeigte keine nukleäre STAT3 Translokation. Die Teilabbildungen a - f sind stärker vergrößerte Fotografien der gekennzeichneten Areale aus A - F. Der Eichbalken in A entspricht in A - F 100 μ m und in a - f 20 μ m. Ausgefüllte Pfeilköpfe weisen auf STAT3 positive, offene Pfeilköpfe auf STAT3 negative Endothelzellen. Farbkomponenten: mit DAPI angefarbte Zellkerne (blau), STAT3 Signale (rot), Zellmarker für Endothelzellen „von-Willebrand-Faktor“ (grün).

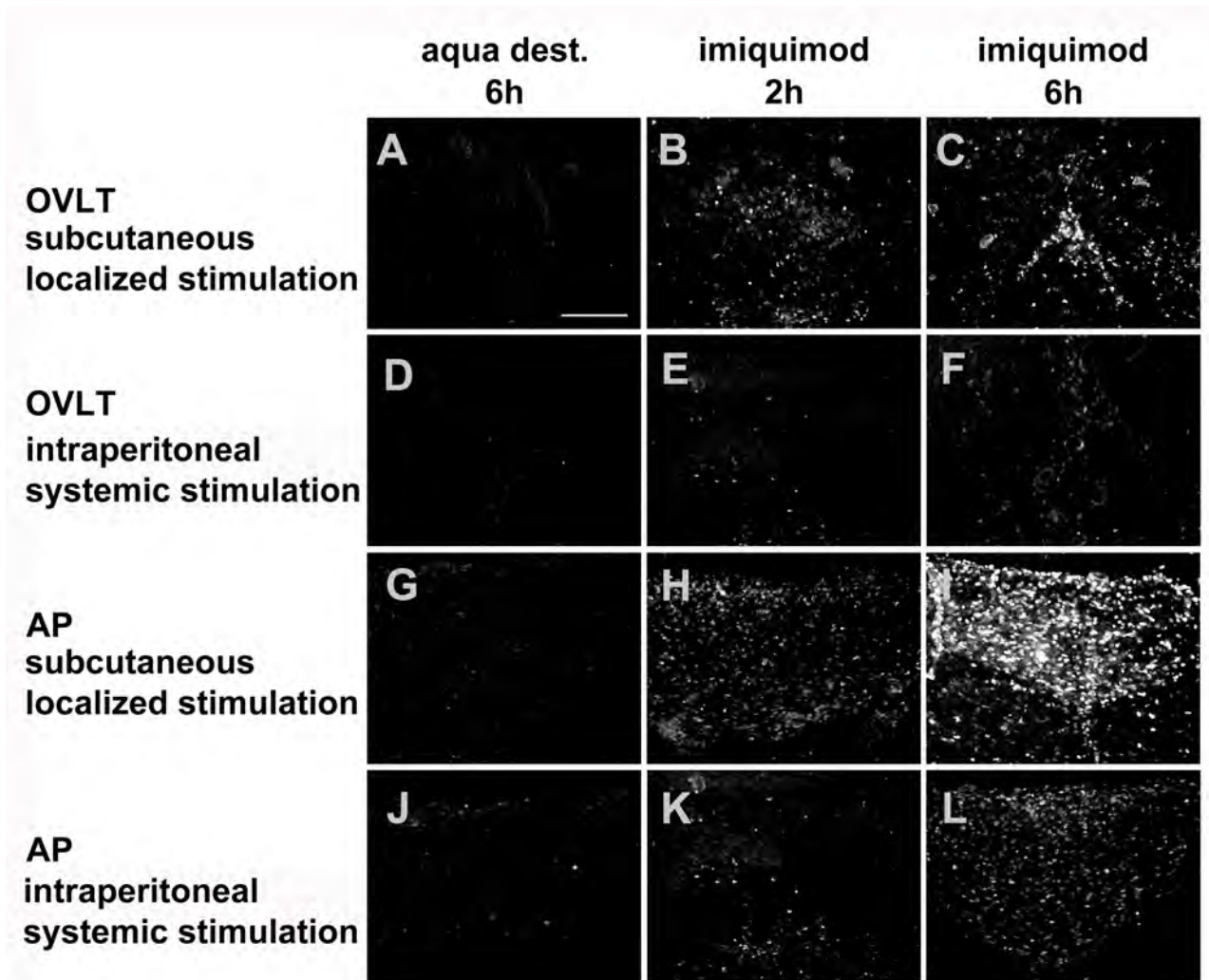


Abb. 34: Vergleichende Darstellung der Anzahl NF-IL6 positiver Zellen in OVLT und AP, zwei und sechs Stunden nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg). Im Vergleich dazu die Zellaktivierung sechs Stunden nach lokaler (SC) Applikation von Aqua ad injectionem. Der Eichbalken in A entspricht 100 μ m in A - L. NF-IL6 Signale stellen sich als helle Punkte auf dem dunklen Hintergrund dar.

NF-IL6

imiquimod
subcutaneous
localized stimulation

imiquimod
intraperitoneal
systemic stimulation

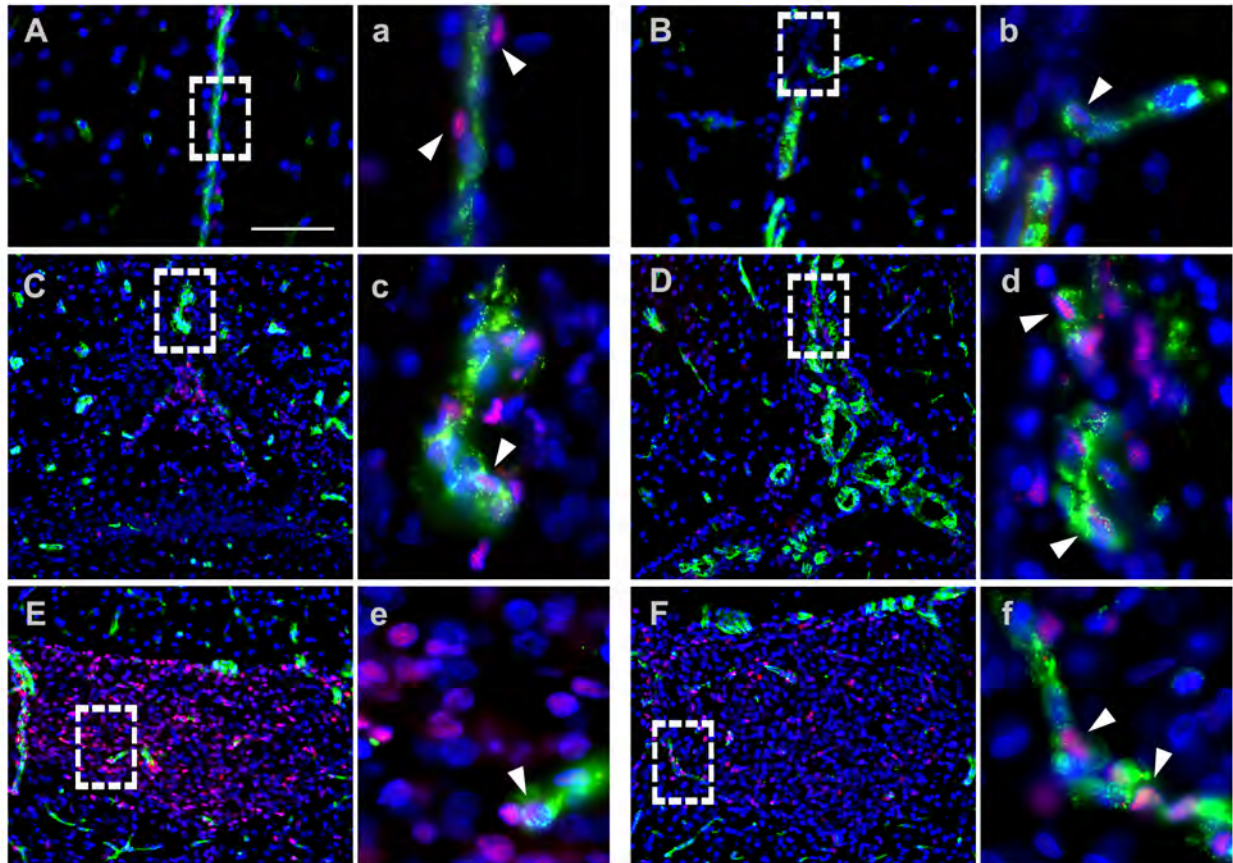


Abb. 35: Nukleäre Immunreaktivität von NF-IL6 in Cortex (A,B), OVLT (C,D) und AP (E,F) sechs Stunden nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Stimulation mit Imiquimod (5 mg/kg). Deutlich zu erkennen ist die stärkere NF-IL6 Aktivierung nach lokaler (SC) Stimulation. Die Teilabbildungen a - f sind stärker vergrößerte Fotografien der gekennzeichneten Areale aus A - F. Der Eichbalken in A entspricht in A und B 50 μ m, in C - F 100 μ m und in a - f 20 μ m. Ausgefüllte Pfeilköpfe weisen auf NF-IL6 positive Endothelzellen. Farbkomponenten: mit DAPI angefarbte Zellkerne (blau), STAT3 Signale (rot), Zellmarker für Endothelzellen „von-Willebrand-Faktor“ (grün).

3.2 LOKALE UND SYSTEMISCHE STIMULATION MIT DEM TLR 9 AGONISTEN ODN 1668

3.2.1 TELEMETRISCHE DATEN

Den endosomalen TLR 7 und 9 werden neben ihrer Lokalisation auch weitgehend identisch verlaufende Signaltransduktionswege zugeschrieben. Im ersten Teil der Arbeit wurden die Kapazitäten des TLR 7 Agonisten Imiquimod zur Induktion zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome und die begleitenden bzw. zu Grunde liegenden molekularen Veränderungen nach systemischer (IP) und lokaler (SC) Applikation charakterisiert.

Im zweiten Teil sollte nunmehr untersucht werden, ob entsprechende Reaktionen auch durch den TLR 9 Agonisten ODN 1668 induzierbar waren. Von besonderem Interesse hierbei war die Beantwortung der Frage, ob *in vivo* die Effekte einer TLR 9 Stimulation bei lokaler (SC) Applikation wiederum stärker ausfielen, als nach systemischer (IP) Gabe des Agonisten. Hierzu wurden wiederum Ratten systemisch (IP) oder lokal (SC) mit ODN 1668 in zwei verschiedenen Dosierungen (1 mg/kg oder 5 mg/kg) behandelt und die Werte mit denen der mit dem Lösungsmittel (Aqua ad injectionem) behandelten Ratten verglichen.

Bis auf kleine Unterschiede, auf die an entsprechender Stelle verwiesen wird, ist dieser Teil der Arbeit analog zum Abschnitt 3.1 („Imiquimod Teil“) aufgebaut. In den Grafiken sind wiederum die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern dargestellt. In die Auswertung aufgenommen wurden für die einzelnen untersuchten Parameter jeweils die Tiere, bei denen die telemetrische Aufzeichnung über den Untersuchungszeitraum von drei Tagen störungsfrei erfolgte. Daraus resultierten für die einzelnen Parameter unterschiedliche Gruppengrößen. Diese sind in Tab. 12 zusammengestellt.

Gruppe	Körper- temperatur	Kumulative Aktivität	Futter- aufnahme	Wasser- aufnahme	Körper- gewicht
<i>ODN 1668, 1 mg/kg, SC</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>
<i>ODN 1668, 5 mg/kg, SC</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>
<i>ODN 1668, 1 mg/kg, IP</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 7</i>
<i>ODN 1668, 5 mg/kg, IP</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 5</i>
<i>Aqua ad injectionem, SC</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>	<i>n = 6</i>
<i>Aqua ad injectionem, IP</i>	<i>n = 8</i>	<i>n = 7</i>	<i>n = 8</i>	<i>n = 8</i>	<i>n = 8</i>

Tab. 12: In die statistische Auswertung aufgenommene Versuchstiere zur Gewinnung der telemetrischen Daten.

3.2.1.1 KÖRPERTEMPERATUR

Abb. 36 zeigt den Verlauf der Körpertemperatur der vier mit ODN 1668 stimulierten Versuchsgruppen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Der Zeitpunkt der Injektion (time 0h) wurde durch einen Pfeil gekennzeichnet und ein Zeitraum von zwei Stunden vor der Injektion als Basalwert abgebildet. Die horizontalen dunklen Balken in den Teilabbildungen repräsentieren die Nachtphase. Die Temperatur wurde in Intervallen von fünf Minuten aufgezeichnet und in Intervallen von 15 Minuten grafisch dargestellt.

Bei allen mit ODN 1668 behandelten Gruppen folgte nach der Injektion ein moderater Anstieg der Körpertemperatur. Bei allen, außer der systemisch (IP) mit der niedrigen (1 mg/kg) Dosis behandelten Gruppe, wurde das Signifikanzniveau überschritten (Tab. 13). Ähnlich wie bei der Behandlung mit Imiquimod zeigten die lokal (SC) stimulierten Tiere eine stärkere Fieberreaktion als die systemisch (IP) stimulierten, wobei ODN 1668 lokal (SC) verabreicht, im Gegensatz zu Imiquimod sogar schon bei Gabe der niedrigen Dosis zu einem signifikanten Anstieg der Körpertemperatur führte.

Die Kontrolltiere zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum den für nachtaktive Säugetiere typischen zirkadianen Temperaturrhythmus, bei welchem das Minimum wäh-

rend der Hell- und das Maximum während der Dunkelphase zu messen ist. Bei den systemisch (IP) mit ODN 1668 behandelten Tieren stellte sich dieser Rhythmus während der ersten Nacht *post injectionem* wieder ein und war dann nicht mehr von dem der Kontrolltiere zu unterscheiden. Während der Nachtphase kam es bei der systemisch (IP) mit der hohen (5 mg/kg) Dosis behandelten Gruppe zu einem punktuellen Abfall der Körpertemperatur, der mit einem gleichzeitigen Anstieg der Körpertemperatur der Kontrollgruppe zusammenfiel, was zu einem der gemessenen Zeitpunkte zu einem signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen führte. Bei den lokal (SC) mit ODN 1668 behandelten Tieren kam es am Ende der Nachtphase noch einmal zu einem signifikanten Anstieg der Körpertemperatur, verglichen mit der Kontrollgruppe. Während des nächsten Tages glich sich das Temperaturniveau der mit ODN 1668 stimulierten und der Kontrollgruppe jedoch wieder vollständig an.

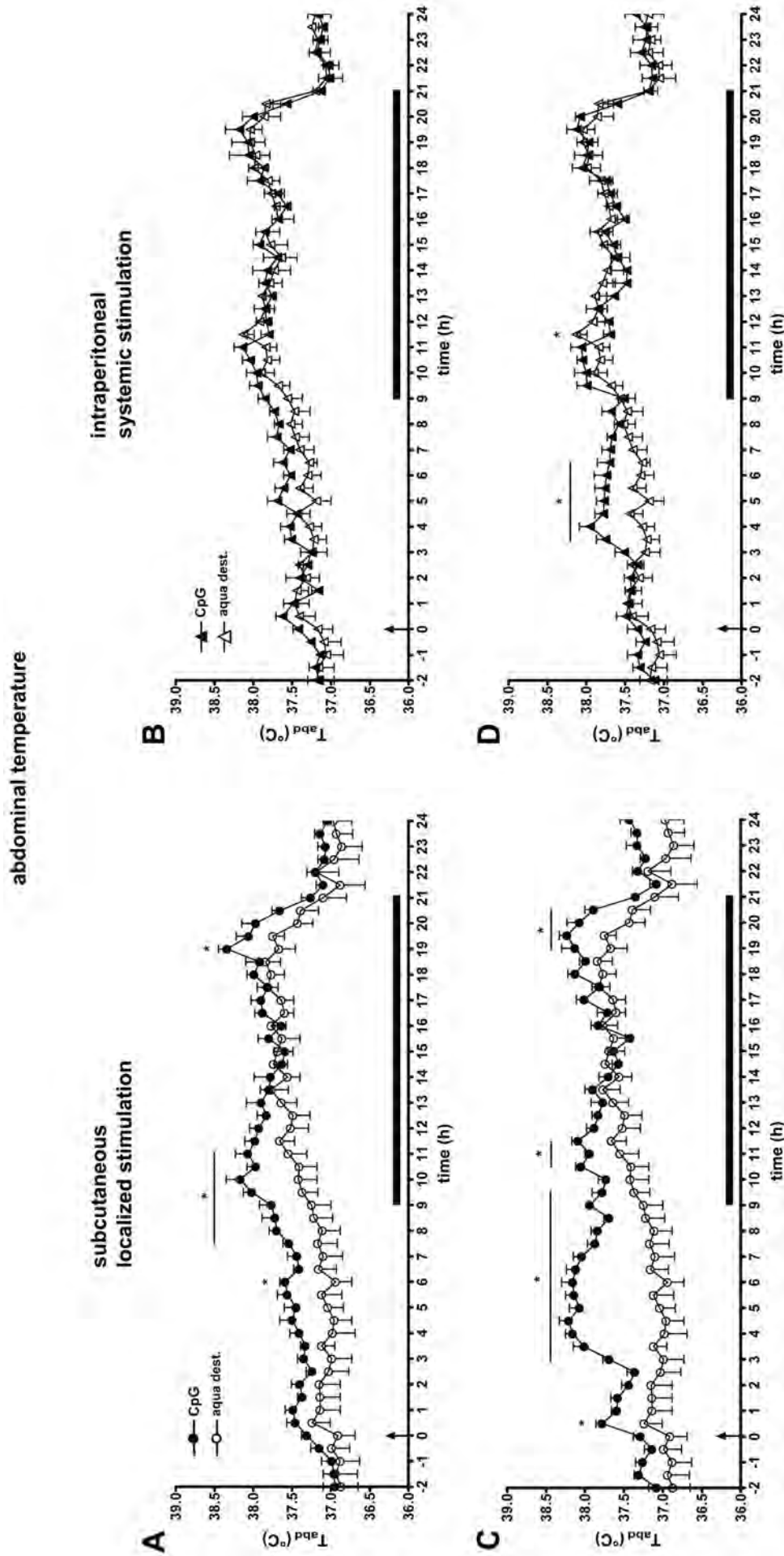


Abb. 36: Verlauf der Körpertemperatur nach lokaler (SC; A,C) und systemischer (IP; B,D) Stimulation mit ODN 1668 im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den mit einem horizontalen, schwarzen Balken mit Asterisk gekennzeichneten Zeiträumen waren die Temperaturunterschiede signifikant ($p < 0,05$). Die schwarzen Balken über der X-Achse in den Teilabbildungen zeigen die Dunkelphase an. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis.

Gruppe	Temperatur max. (° C)	Signifikanter Zeitraum (min)	Schnittpunkt der Temperaturkurve mit der Temperaturkurve der Kontrollgruppe (in Stunden)
<i>ODN 1668, 1 mg/kg, SC</i>	$38,34 \pm 0,11$	360; 450 – 660; 1140	13,5
<i>ODN 1668, 1 mg/kg, IP</i>	$38,33 \pm 0,14$	---	---
<i>ODN 1668, 5 mg/kg, SC</i>	$38,25 \pm 0,13$	30; 180 – 570; 630 – 690; 1140 – 1230	13,5
<i>ODN 1668, 5 mg/kg, IP</i>	$38,16 \pm 0,15$	210 – 390; 690	8

Tab. 13: Charakteristika der durch ODN 1668 induzierten Fieberreaktion.

3.2.1.2 MOTORISCHE AKTIVITÄT

Die Analyse der motorischen Aktivität zeigte in der Hellphase der lokal (SC) mit ODN 1668 (1 mg/kg) stimulierten Gruppe und in der ersten Dunkelphase beider systemisch (IP) stimulierter Gruppen signifikante Unterschiede verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe (Abb. 37). In den anderen Zeitintervallen wurde kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe gemessen. Das physiologische Muster erhöhter Nachtaktivität (ca. 4000 bis 5000 Counts) und niedriger Tagesaktivität (ca. 1000 bis 2000 Counts) blieb bei allen Versuchsgruppen erhalten und wurde durch die Behandlung mit ODN 1668 somit nicht beeinträchtigt.

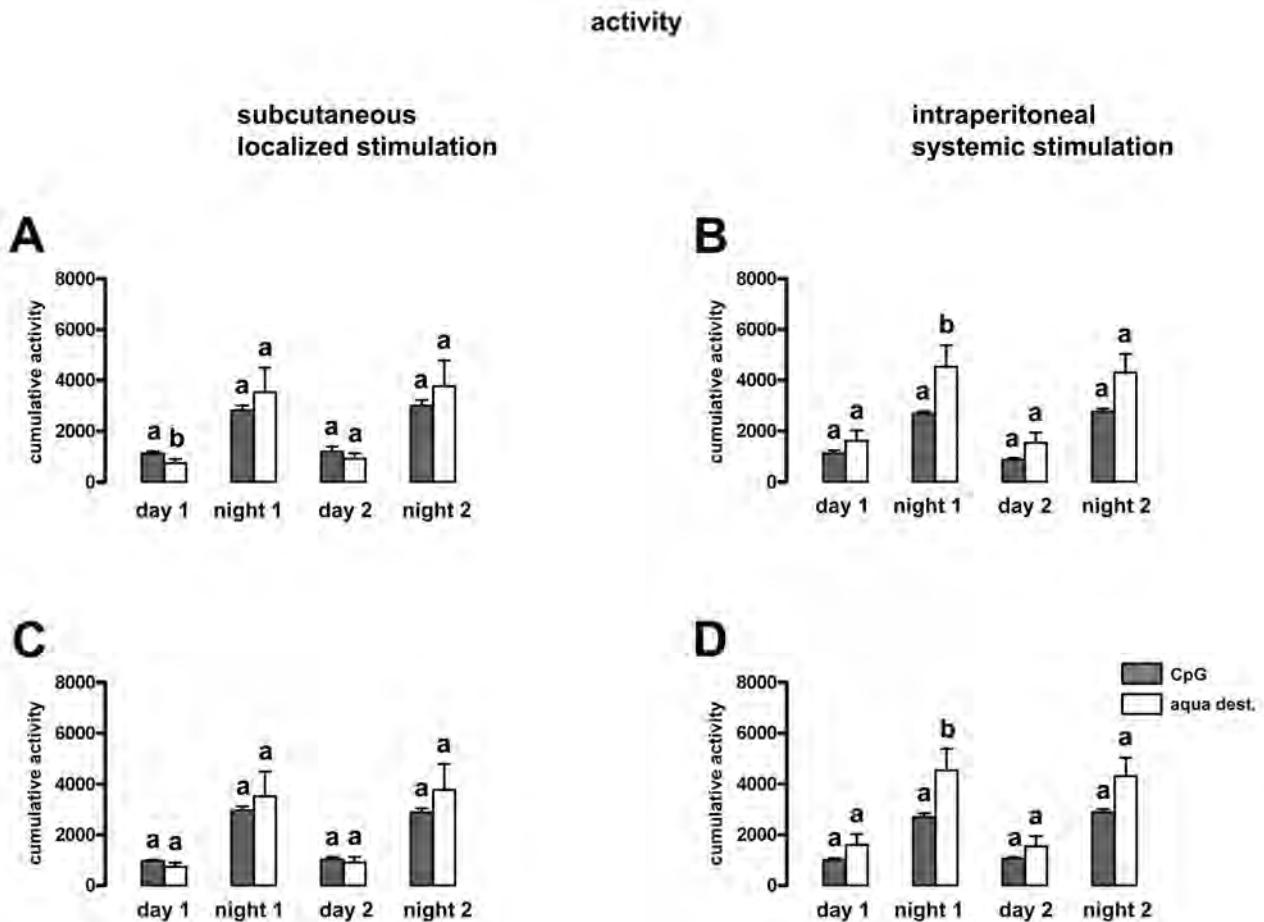


Abb. 37: Kumulative Aktivität nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit ODN 1668 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen im zu vergleichenden Zeitraum an. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis. „day 1“/„night 1“ repräsentiert den Injektionstag, „day 2“/„night 2“ den darauffolgenden Tag.

3.2.1.3 FUTTER- UND WASSERAUFNAHME

Ähnlich wie nach der Behandlung mit Imiquimod zeigten die lokal (SC) oder systemisch (IP) mit ODN 1668 (5 mg/kg) behandelten Tiere am Injektionstag eine partielle Anorexie, die zu signifikanten Unterschieden gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe führte (Abb. 38). Bei den mit der niedrigen (1 mg/kg) ODN 1668 Dosis behandelten Gruppen blieb die Futteraufnahme unbeeinträchtigt. Die p- und F-Werte der jeweils signifikant unterschiedlichen Gruppen sind in Tab. 14 zusammengestellt. Da die während der Hellphase aufgenommene Futter- und Wassermengen sehr gering waren, wurde der Verbrauch über 24 Stunden dargestellt. Am folgenden Tag nahmen die Tiere aller Gruppen wieder ähnliche Futtermengen von mindestens 16,9 g bis höchstens 18,7 g auf.

Zu einem signifikanten Abfall der Wasseraufnahme kam es bei der systemisch (IP) mit der hohen (5 mg/kg) ODN 1668 Dosis behandelten Gruppe am Tag der Injektion (Abb. 39).

Ansonsten kam es während des gesamten Versuchsablaufs zu keinen signifikanten Änderungen der Wasseraufnahme. Im Gegensatz zu Imiquimod verursachte ODN 1668 zumindest unter bestimmten Bedingungen (hohe Dosis, systemische (IP) Gabe) eine moderate Adipsie.

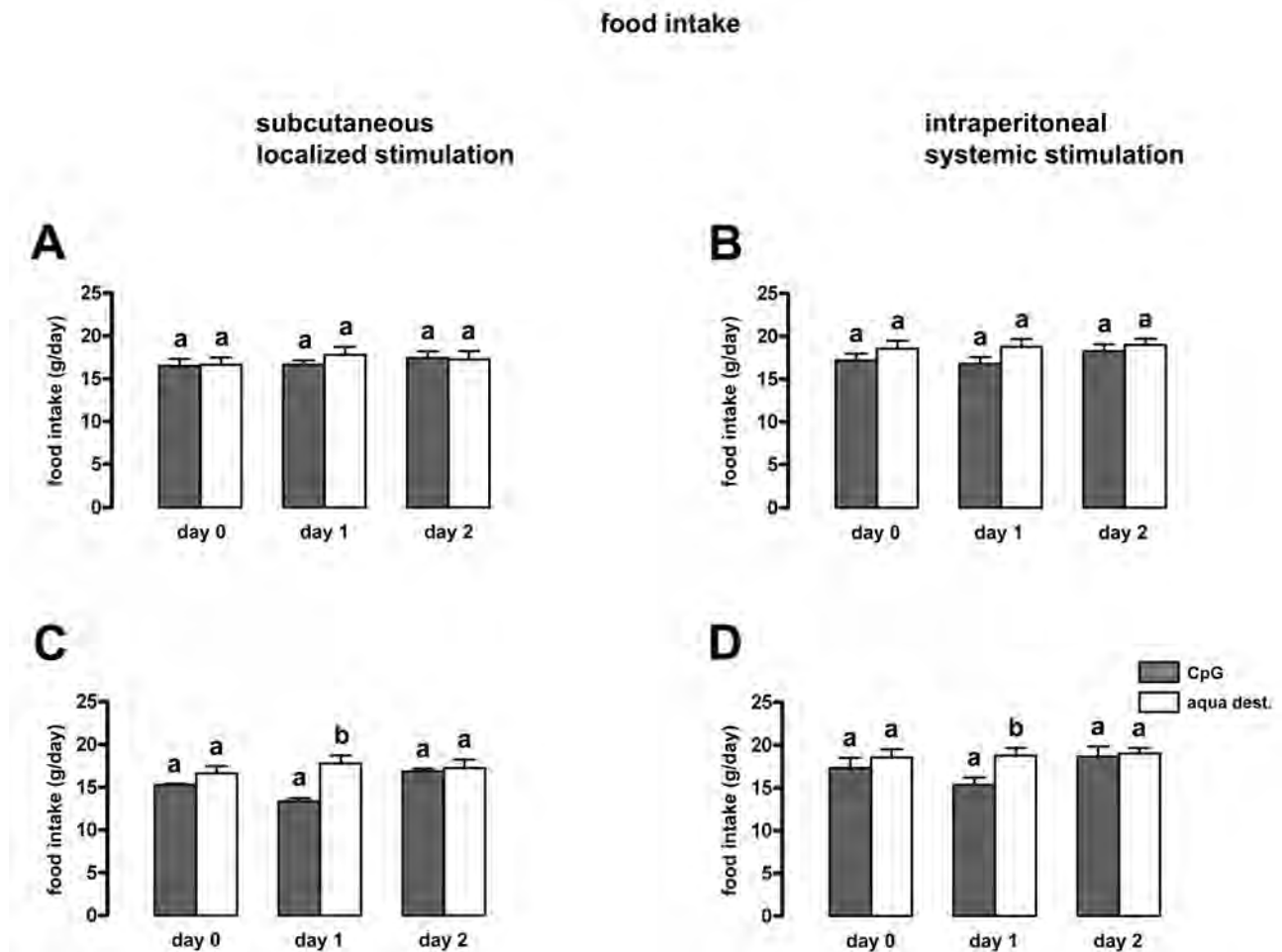


Abb. 38: Futteraufnahme nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit ODN 1668 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen am zu vergleichenden Tag an. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis. „day 1“ repräsentiert die ersten 24 Stunden post injectionem. „day 0“ die 24 Stunden vor der Injektion.

Gruppe	Futterraufnahme (g / 24h)	F-Wert	p-Wert
ODN 1668, SC, 5 mg/kg, day 1	13,4 ± 0,4	20,892	0,001
Aqua ad injectionem, SC, day 1	17,8 ± 0,9		
ODN 1668, IP, 5 mg/kg, day 1	15,3 ± 0,9	7,063	0,0209
Aqua ad injectionem, IP, day 1	18,7 ± 0,9		

Tab. 14: Signifikante Unterschiede in der Futterraufnahme nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) am Tag der Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe.

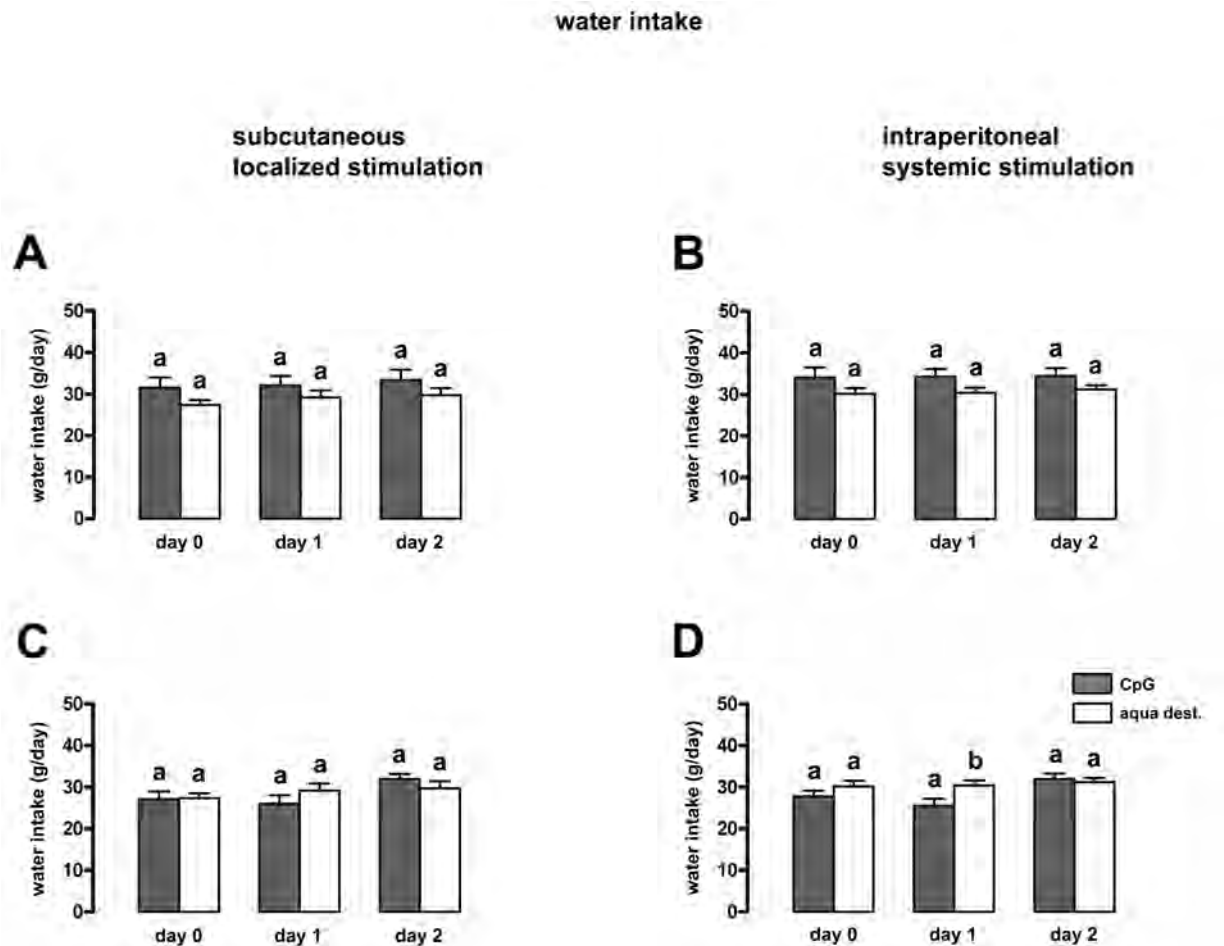


Abb. 39: Wasseraufnahme nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit ODN 1668 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den jeweiligen Gruppen am zu vergleichenden Tag an. A und B zeigen die Reaktion auf die niedrige (1 mg/kg), C und D auf die hohe (5 mg/kg) Dosis. „day 1“ repräsentiert die ersten 24 Stunden post injectionem. „day 0“ die 24 Stunden vor der Injektion.

3.2.1.4 KÖRPERGEWICHT

Die sehr moderate Anorexie, die am Injektionstag nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Stimulation mit der hohen ODN 1668 Dosis beobachtet wurde, wirkte sich nicht signifikant auf die Körpergewichtsentwicklung der Tiere aus. Diese gestaltete sich in der mit ODN 1668 behandelten Gruppe recht heterogen. So zeigten einzelne Gruppen am Tag vor der Injektion unterschiedliche Gewichtszunahmen, so dass auf genauere Darstellung und Analyse dieses Parameters verzichtet wurde.

3.2.2 MOLEKULARE UNTERSUCHUNGEN

Aufgrund der telemetrisch erhobenen Befunde wurden die nachfolgenden molekularen Untersuchungen ausschließlich mit Probenmaterial von Ratten erhoben, die lokal (SC) oder systemisch (IP) mit der hohen Dosis (5 mg/kg) ODN 1668 stimuliert wurden, und mit den Daten entsprechender Kontrollgruppen verglichen.

3.2.2.1 EXPRESSIONSMUSTER VON INTERFERONEN IN LEBER UND MILZ AUF mRNA-EBENE MITTELS RT-PCR

Im ersten Schritt der molekularen Untersuchungen wurde wiederum die Kapazität des TLR 9 Agonisten ODN 1668 zur Stimulation einer Expression von IFN in Leber und Milz auf mRNA-Ebene analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 40 und Abb. 41 zusammengefasst.

LEBER (ABB. 40)

Ähnlich wie nach Stimulation mit Imiquimod, kam es nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Injektion in der Leber zu keinem signifikanten Anstieg der Expression von IFN α und IFN β . Lediglich sechs Stunden nach lokaler (SC), nicht aber nach systemischer (IP) Stimulation mit ODN 1668 kam es zu einer leichten, aber signifikanten Erhöhung der IFN γ Expression, die aber im Vergleich zur Stimulation mit Imiquimod sehr moderat ausfiel (ca. 10-facher vs. 2000-facher Anstieg; siehe Abb. 22).

MILZ (ABB. 41)

In der Milz stellte sich die IFN α Expression nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Applikation von ODN 1668 signifikant „downreguliert“ gegenüber der Kontrollgruppe dar. Allerdings überschritt der sechs Stunden Wert nach systemischer (IP) Injektion das Signifikanz-

niveau nicht. Die IFN β Expression war tendenziell ebenfalls „downreguliert“ überschritt jedoch zu keinem der gemessen Zeitpunkte das Signifikanzniveau.

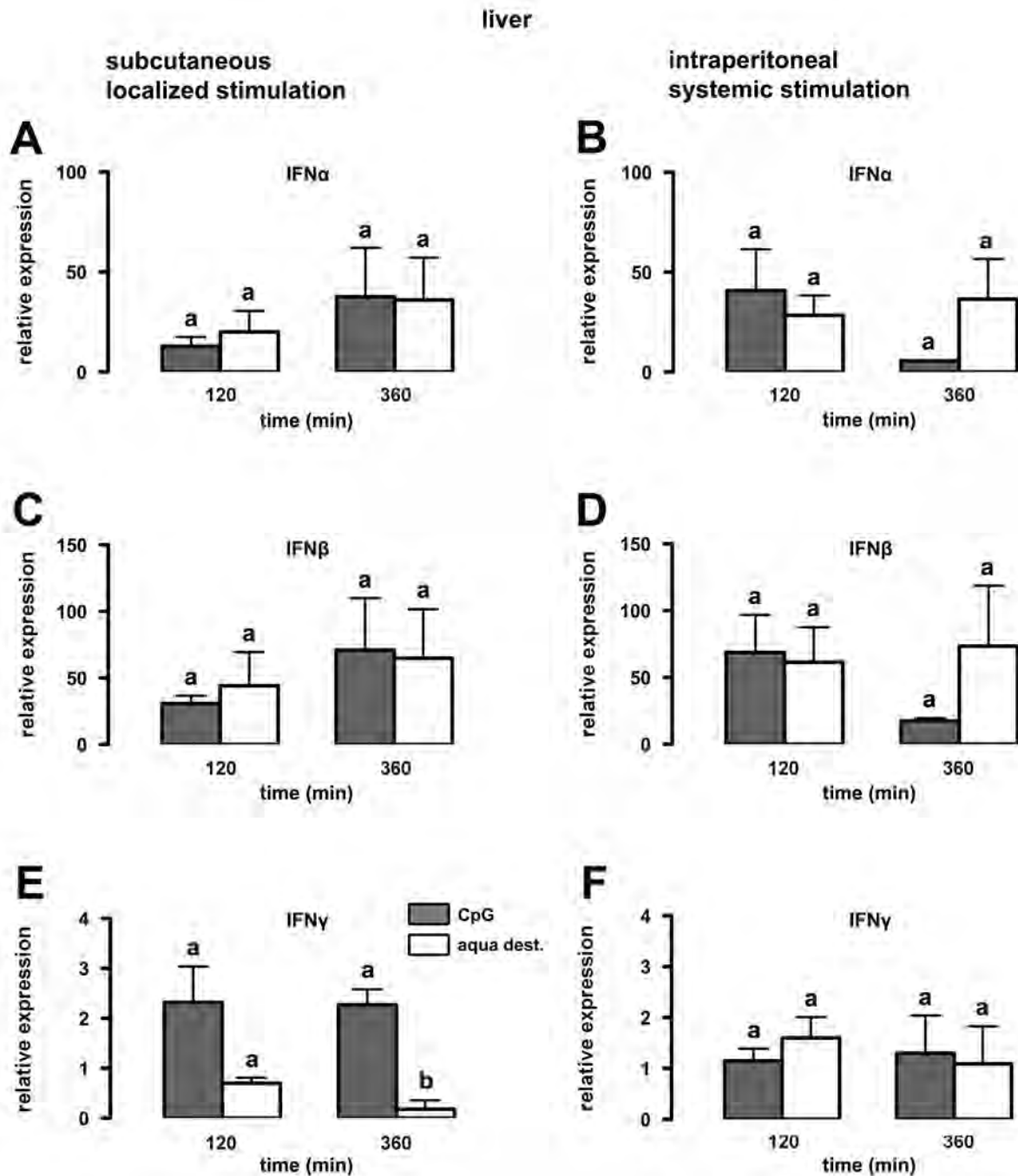


Abb. 40: Relative Interferonexpression in der Leber nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

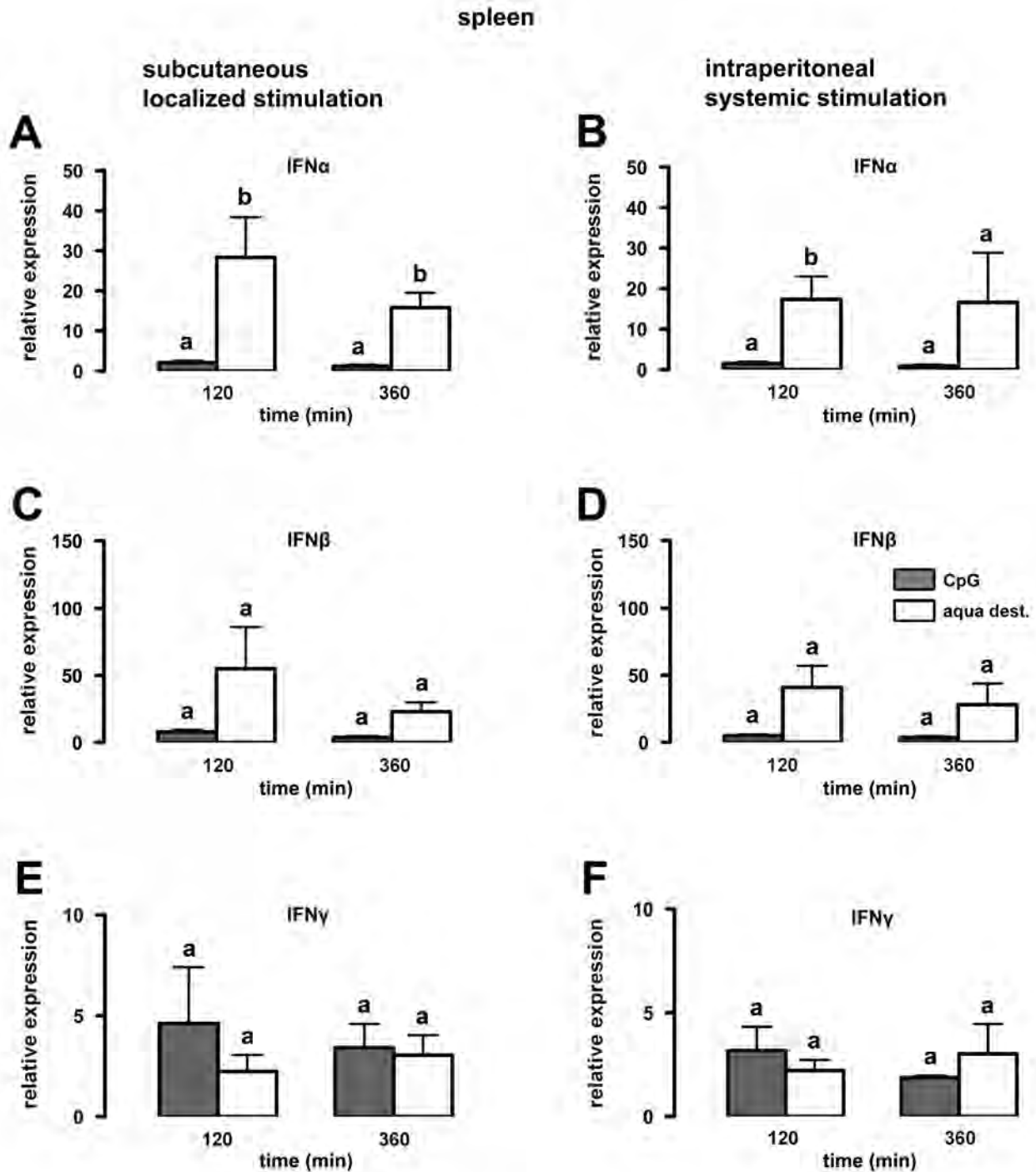


Abb. 41: Relative Interferonexpression in der Milz nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der TLR 9 Agonist ODN 1668 im Gegensatz zum TLR 7 Agonisten Imiquimod in den peripheren Organen Leber und Milz keine starke Kapazität zur Induktion von IFN γ aufwies.

3.2.2.2 ZYTOKIN GEHALT IN PLASMA- UND LAVAGEPROBEN

Analog zu den mit Imiquimod durchgeführten Experimenten sollte untersucht werden, ob ODN 1668 (5 mg/kg) nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Applikation in der Lage ist, in Plasma- und Lavageproben eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine zu induzieren. Dazu wurden Ratten lokal (SC) oder systemisch (IP) mit ODN 1668 stimuliert und Plasma und / oder Lavageproben nach zwei oder sechs Stunden gewonnen.

IL-6 (ABB. 42)

Nach systemischer (IP) oder lokaler (SC) Stimulation mit der hohen (5 mg/kg) ODN 1668 Dosis stiegen die IL-6 Werte in Plasma und Lavage nach zwei und sechs Stunden signifikant gegenüber der Kontrollgruppe an. Dieser Anstieg an IL-6 fiel im Vergleich zu den mit Imiquimod erhobenen Daten sogar stärker aus.

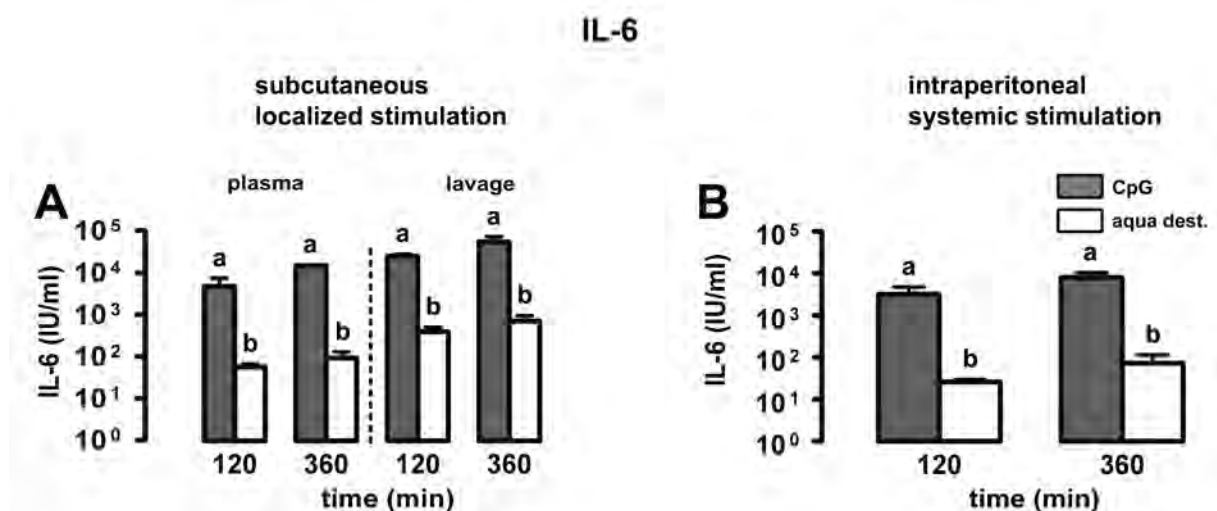


Abb. 42: IL-6 Gehalt in Blutplasma und Lavageflüssigkeit nach lokaler (A) und systemischer (B) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an. Aufgrund der hohen Streuung der Werte wurde die IL-6 Konzentration in beiden Teilabbildungen logarithmisch dargestellt.

TNF α (ABB. 43)

Nach lokaler (SC) Stimulation mit der hohen (5 mg/kg) ODN 1668 Dosis kam es in der Lavageflüssigkeit nach zwei und sechs Stunden zu einem moderaten Anstieg der TNF α Konzentration, die zum ersten gemessenen Zeitpunkt signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe war. Nach sechs Stunden war in der Lavageflüssigkeit der Kontrollgruppe kein

TNF α mehr zu detektieren. Zu einem Auftreten von TNF α im Blutplasma der lokal (SC) stimulierten Gruppe kam es weder nach zwei noch nach sechs Stunden. Bei der systemisch (IP) stimulierten Gruppe stiegen nach zwei Stunden die TNF α Konzentration im Plasma leicht an. Sechs Stunden nach Stimulation war kein TNF α mehr zu detektieren. Bei der Kontrollgruppe war zu keinem Zeitpunkt TNF α im Blut detektierbar.

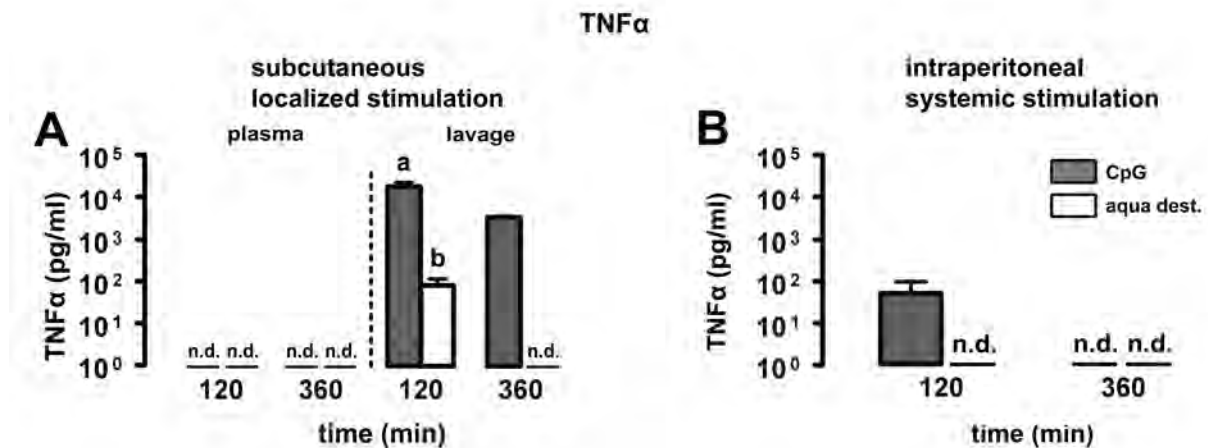


Abb. 43: TNF α Gehalt in Blutplasma und Lavageflüssigkeit nach lokaler (A) und systemischer (B) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an. Die Abkürzung n.d. steht für „nicht detektierbar“. Aufgrund der hohen Streuung der Werte wurde die TNF α Konzentration in beiden Teilabbildungen logarithmisch dargestellt.

IFN γ (ABB. 44)

Weder nach lokaler (SC) noch nach systemischer (IP) Applikation von ODN 1668 (5 mg/kg) kam es zu einem signifikanten Anstieg der IFN γ Konzentration in Blutplasma oder Lavageflüssigkeit.

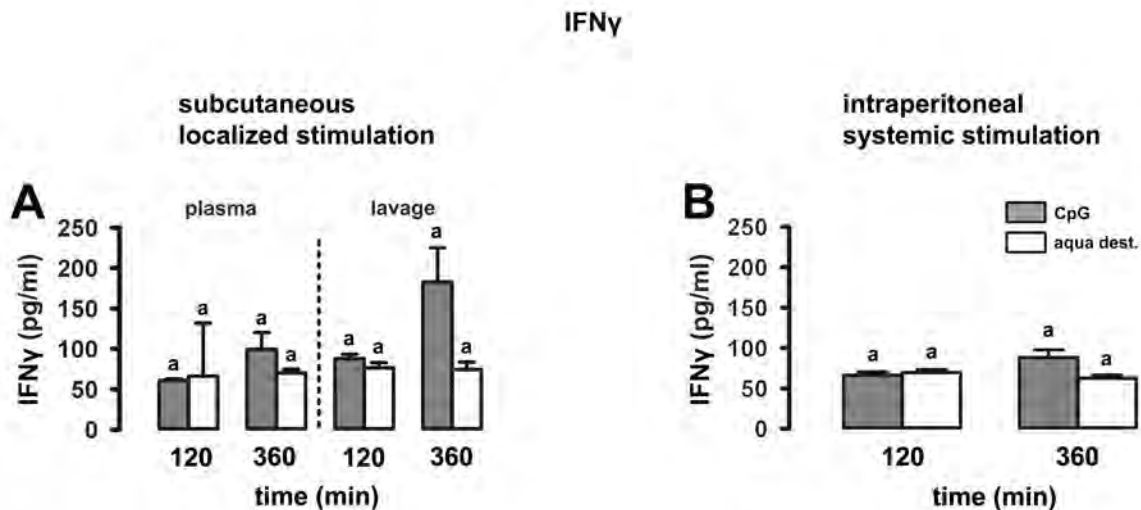


Abb. 44: IFN γ Gehalt in Blutplasma und Lavageflüssigkeit nach lokaler (A) und systemischer (B) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

3.2.2.3 EXPRESSIONSMUSTER RELEVANTER INFLAMMATORISCHER SIGNALMOLEKÜLE IM HYPOTHALAMUS AUF mRNA-EBENE MITTELS RT-PCR

Im nächsten Schritt sollte die Produktion von mRNA derselben für die Entzündung relevanter Signalmoleküle mittels quantitativer real-time PCR untersucht werden, die bereits bei den mit Imiquimod behandelten Tieren analysiert wurden. Dazu wurde das in Kap. 2.3.2 gewonnene Gewebe verwendet und nach dem in Kap. 2.3.3.3 beschriebenen Protokoll weiterbearbeitet. Betrachtet wurden jeweils der zwei und sechs Stunden Zeitpunkt nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg), im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.

TRANSKRIPTIONSFAKTOREN (ABB. 45):

Die Expressionsmuster der jeweiligen Marker der Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren stellte sich im Hypothalamus für TLR 7 und TLR 9 Agonisten ähnlich dar. Lediglich für SOCS3 kam es nach Stimulation mit ODN 1668 zu einem signifikanten Expressionsanstieg, der jedoch stärker ausfiel, als nach Behandlung mit Imiquimod, was zu den höheren zirkulierenden IL-6 Spiegeln nach TLR 9 Stimulation passte.

Die SOCS3 Expression zeigte zu beiden Zeitpunkten nach systemischer (IP) Injektion einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Nach lokaler (SC) Injektion zeigte sich

prinzipiell ein ähnliches Expressionsmuster, das Signifikanzniveau wurde jedoch lediglich zum zwei Stunden Zeitpunkt überschritten. Für die Expression von NF-IL6 ergab sich zwei Stunden nach lokaler (SC) Injektion von ODN 1668 sogar eine signifikante Abschwächung im Hypothalamus.

ZYTOKINE (ABB. 46 - ABB. 47):

Im Hypothalamus kam es sechs Stunden nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Injektion von ODN 1668 zu einer signifikanten Reduktion der IFN α Expression. Sechs Stunden nach lokaler (SC) Applikation war bei der Kontrollgruppe auf mRNA Ebene im Hypothalamus kein IFN γ zu detektieren.

Die hypothalamische TNF α und IL-1 Expressionen stellten sich zwei und sechs Stunden nach systemischer (IP) Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht dar, während dies für IL-6 nur tendenziell der Fall war. Die Expression von TNF α , IL-1 und IL-6 zeigte nach lokaler (SC) Injektion im Ansatz das gleiche Muster wie nach systemischer (IP), überschritt jedoch zu keinem Zeitpunkt und für keines der Zytokine das Signifikanzniveau.

SCHLÜSSELENZYME DER PROSTAGLANDINSYNTHESE (ABB. 48):

Zu einer signifikanten Erhöhung der COX 2 Expression kam es sechs Stunden nach lokaler (SC) Injektion von ODN 1668. Dies entsprach etwa dem mit Imiquimod erzielten Effekt. Sechs Stunden nach Injektion war die mPGES Expression sowohl bei den lokal (SC) als auch bei den systemisch (IP) behandelten Tieren signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Die Steigerung der mPGES fiel nach Gabe von ODN 1668 bei beiden Applikationsarten sogar deutlich stärker aus als nach Injektion von Imiquimod.

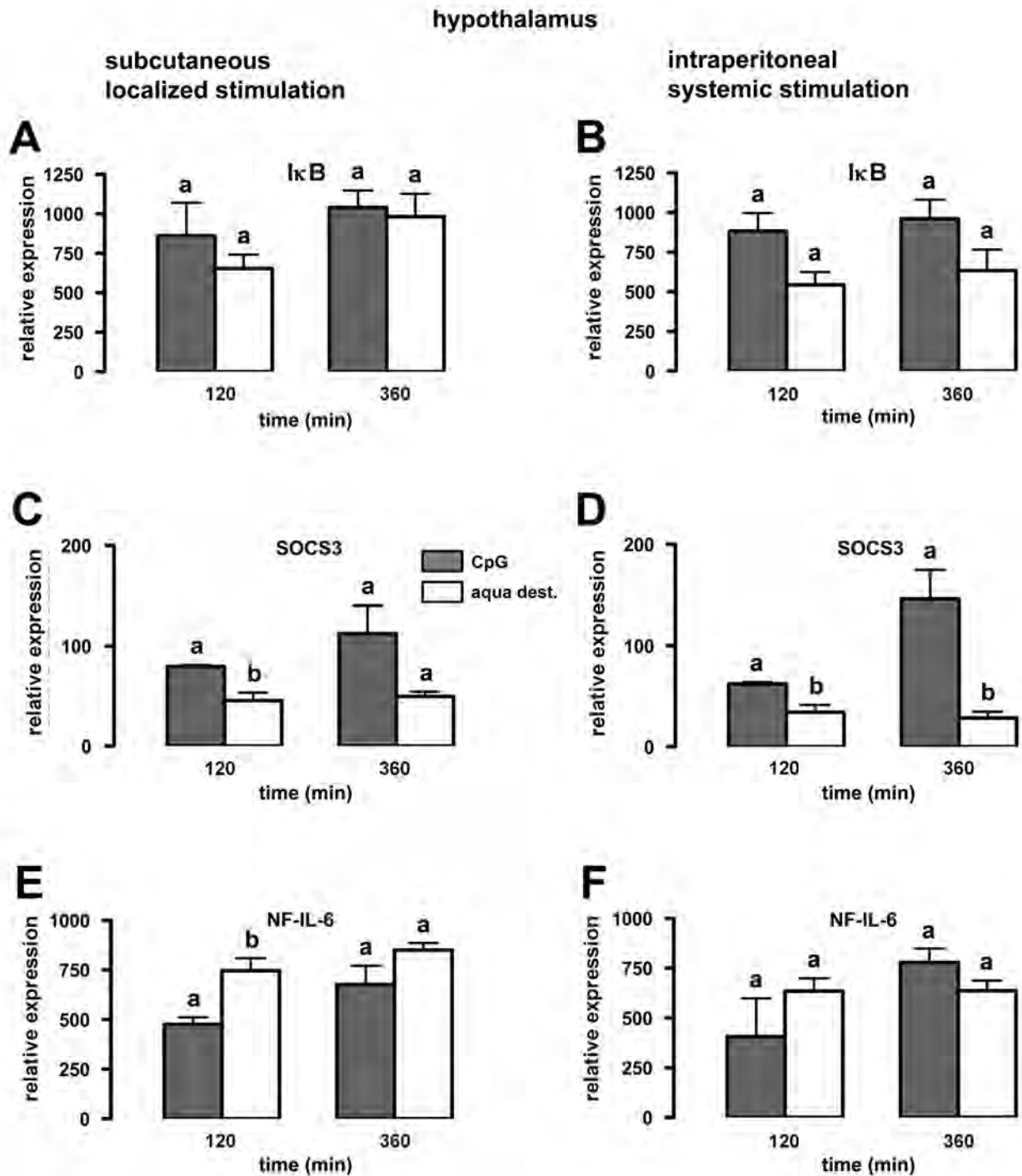


Abb. 45: Relative Expression von Transkriptionsfaktoren im Hypothalamus nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

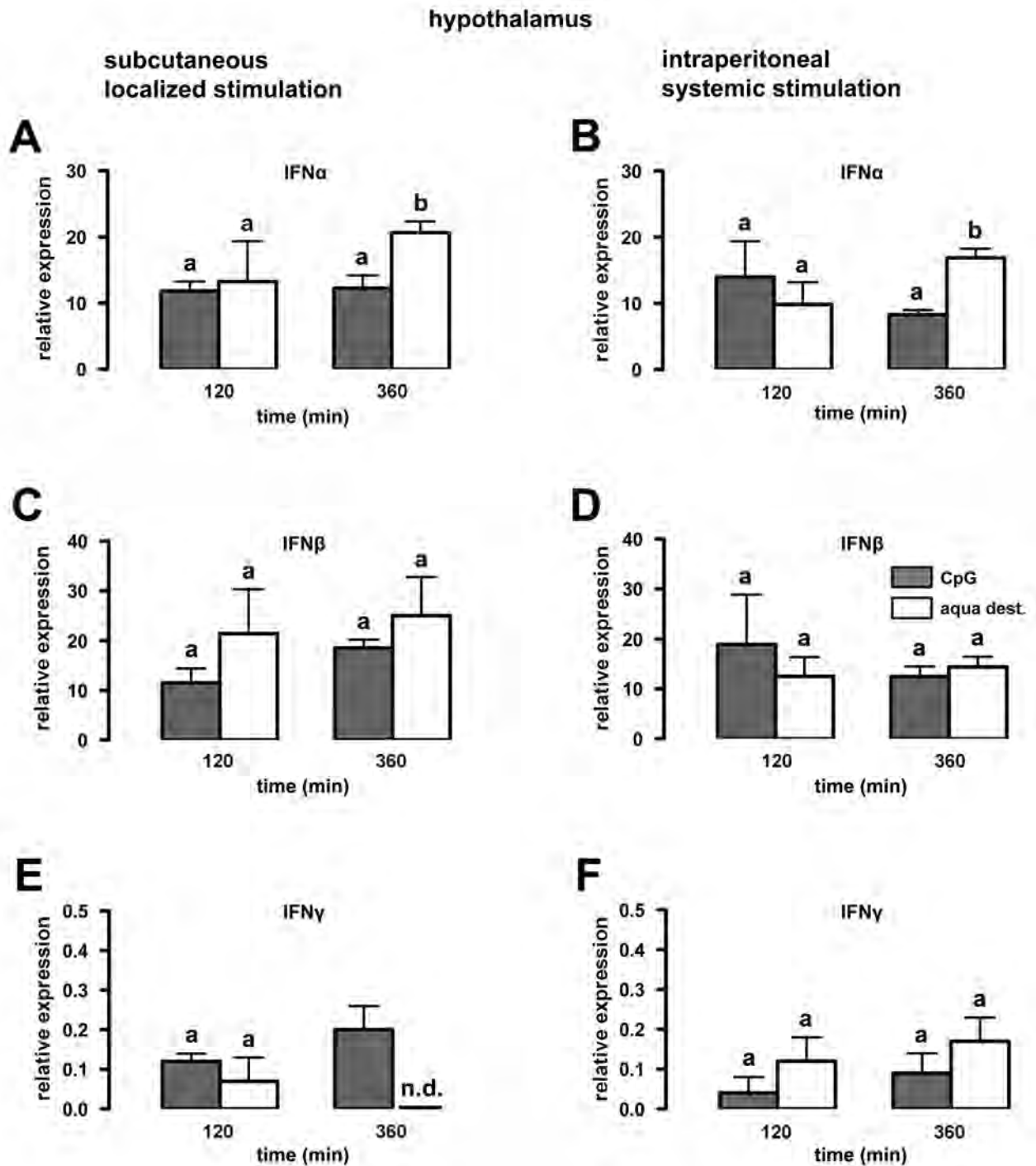


Abb. 46: Relative Interferonexpression in Hypothalamus nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an. Die Abkürzung n.d. steht für „nicht detektierbar“.

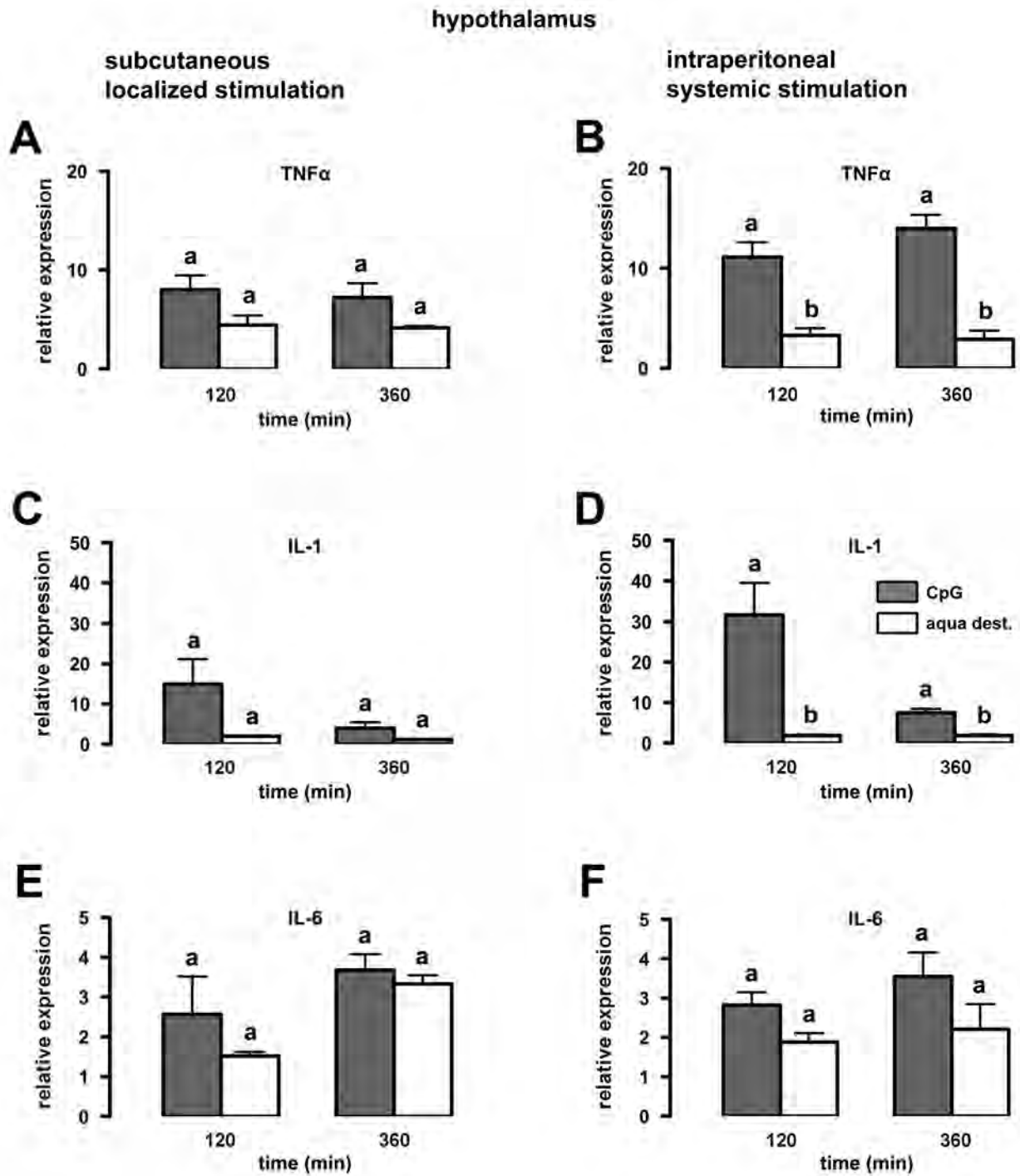


Abb. 47: Relative Zytokinexpression im Hypothalamus nach lokaler (A,C,E) und systemischer (B,D,F) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

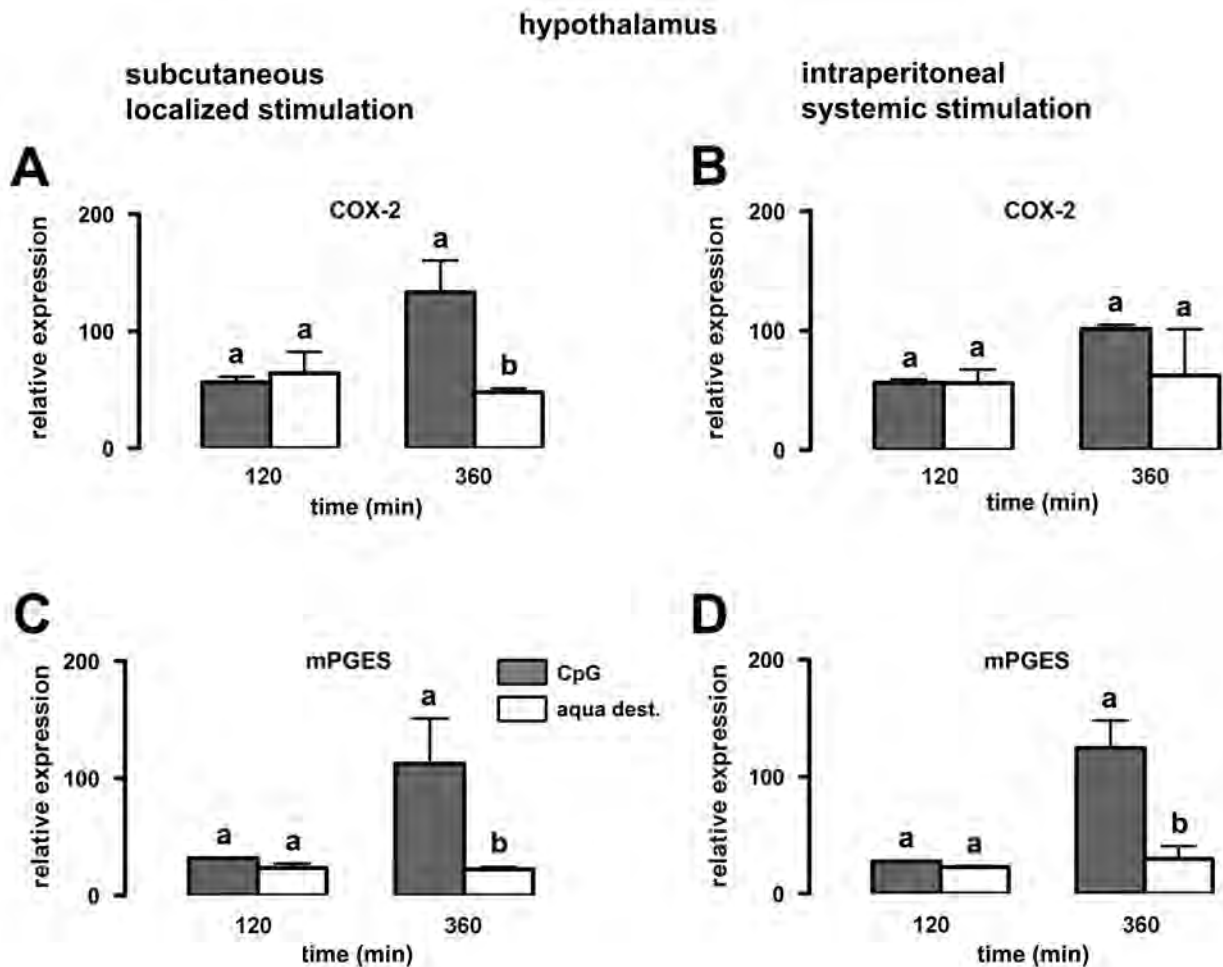


Abb. 48: Relative Expression der Schlüsselenzyme für die Prostaglandinsynthese im Hypothalamus nach lokaler (A,C) und systemischer (B,D) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt an.

3.2.2.4 EXPRESSIONSMUSTER RELEVANTER INFLAMMATORISCHER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN AUF PROTEINEBENE MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE

Mittels indirekter Immunfluoreszenz sollte ermittelt werden, ob die durch ODN 1668 ausgelösten Krankheitssymptome sich ebenfalls in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Hypothalamus in Form einer nuklearen Translokation von NF- κ B, STAT3, und NF-IL6 widerspiegeln.

Analog zum Abschnitt 3.1 („Imiquimod Teil“) der Arbeit wurde die Aktivierung der drei Transkriptionsfaktoren in den CVOs, OVLT und AP sowie dem Cortex, zwei und sechs Stunden nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Injektion von ODN 1668 bzw. dem Lösungsmittel Aqua ad injectionem untersucht. Zur Phänotypisierung von Endothelzellen, welche eine

Translokation des Transkriptionsfaktors aus dem Zytoplasma in den Nukleus bzw. im Fall von NF- κ B in die perinukleäre Region zeigten, wurden Bilder durch Überlagerung von Einzelabbildungen erzeugt. So konnte die Kolokalisation von Signal (Transkriptionsfaktor), Zellkern (Kernfärbung) und Zelltyp (vW positive Endothelzelle) belegt werden.

NF- κ B (ABB. 49)

Dargestellt ist die NF- κ B Aktivierung in Endothelzellen des Cortex, im OVLT und in der AP nach lokaler (SC) Injektion von ODN 1668 (5 mg/kg) verglichen mit der Injektion von Aqua ad injectionem zum zwei Stunden Zeitpunkt. Nach systemischer (IP) Injektion ergab sich ein vergleichbares Bild.

In allen untersuchten Hirnregionen lassen sich bei den mit ODN 1668 behandelten Tieren vereinzelt Endothelzellen nachweisen, die eine nukleäre oder perinukleäre Immunreaktivität von NF- κ B aufweisen. Sechs Stunden nach Injektion stellte sich ein ähnliches Bild mit vereinzelt NF- κ B positiven Zellen dar. Bei den mit der Kontrolllösung behandelten Tieren waren keine nukleären aber selten perinukleäre NF- κ B Signale zu detektieren. Der Einfluss von ODN 1668 auf die NF- κ B Aktivierung nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Injektion sollte demnach als gering eingestuft werden.

STAT3 (ABB. 50)

In OVLT, AP und Cortex der mit ODN 1668 (5 mg/kg) stimulierten Tiere waren, unabhängig von der Applikationsart, zum zwei und sechs Stunden Zeitpunkt einzelne Endothelzellen mit aktiviertem STAT3 in den Zellkernen zu detektieren. Dargestellt ist der zwei Stunden Zeitpunkt nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Injektion verglichen mit der Kontrollgruppe nach lokaler (SC) Injektion von Aqua ad injectionem. Aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl aktivierter Zellen wurde auf die quantifizierende Bewertung zwischen lokaler (SC) und systemischer (IP) Injektion verzichtet. Jedoch stellte sich die nukleäre STAT3 Immunreaktivität nach Gabe von ODN 1668 insgesamt etwas stärker dar, als nach Stimulation mit Imiquimod was wiederum im Einklang mit den höheren IL-6 Spiegeln im Blut dieser Tiere stand. Bei den lokal (SC) oder systemisch (IP) mit Aqua ad injectionem behandelten Tieren war keine STAT3 Aktivierung zu detektieren.

NF-IL6 (ABB. 51)

Nach Stimulation mit ODN 1668 zeigte sich eine Translokation von NF-IL6 Molekülen in Zellkerne, die je nach Applikationsart und untersuchtem CVO unterschiedlich stark ausge-

prägt war. Vor allem im OVLT kam es nach lokaler (SC) Applikation zu einer Zunahme NF-IL6 positiver Zellen. In Cortex und AP fanden sich sowohl nach lokaler (SC), als auch nach systemischer (IP) Injektion einzelne aktivierte Endothelzellen. Im Unterschied zur Behandlung mit Imiquimod fiel die NF-IL6 Aktivierung nach Stimulation mit ODN 1668 eher moderat aus. Dargestellt ist der sechs Stunden Zeitpunkt nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Injektion von ODN 1668, verglichen mit der Kontrollgruppe nach lokaler (SC) Injektion von Aqua ad injectionem.

NF- κ B

aqua dest.
subcutaneous
localized stimulation

CpG
subcutaneous
localized stimulation

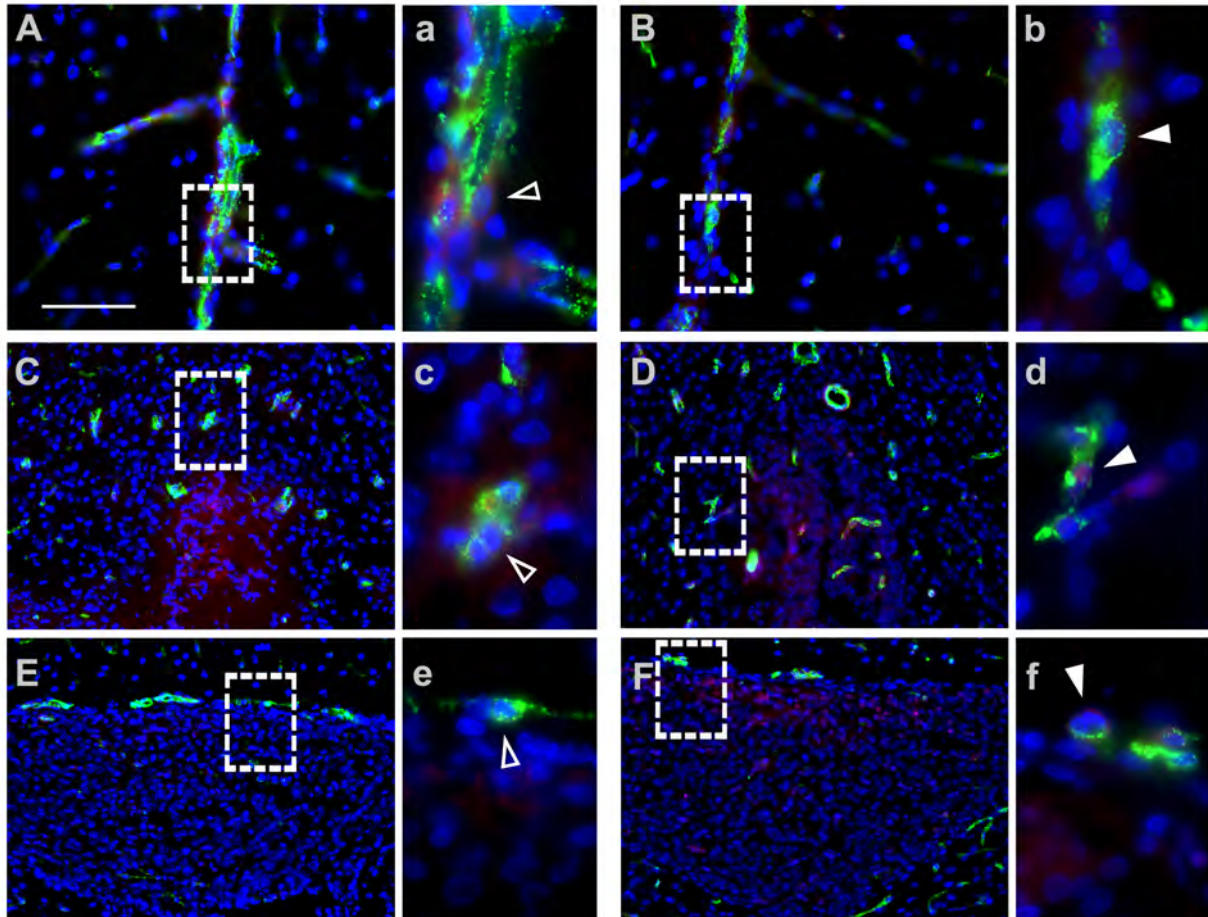


Abb. 49: (Peri-)Nukleäre Immunreaktivität von NF- κ B in Cortex (A,B), OVLT (C,D) und AP (E,F) zwei Stunden nach lokaler (SC) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Aqua ad injectionem. Die Kontrollgruppe zeigte keine nukleäre jedoch selten eine perinukleäre NF- κ B Akkumulation. Die Teilabbildungen a - f sind stärker vergrößerte Fotografien der gekennzeichneten Areale aus A - F. Der Eichbalken in A entspricht in A und B 50 μ m, in C - F 100 μ m und in a - f 20 μ m. Ausgefüllte Pfeilköpfe weisen auf NF- κ B positive, offene Pfeilköpfe auf NF- κ B negative Endothelzellen. Farbkomponenten: mit DAPI angefärbte Zellkerne (blau), NF- κ B Signale (rot), Zellmarker für Endothelzellen „von-Willebrand-Faktor“ (grün).

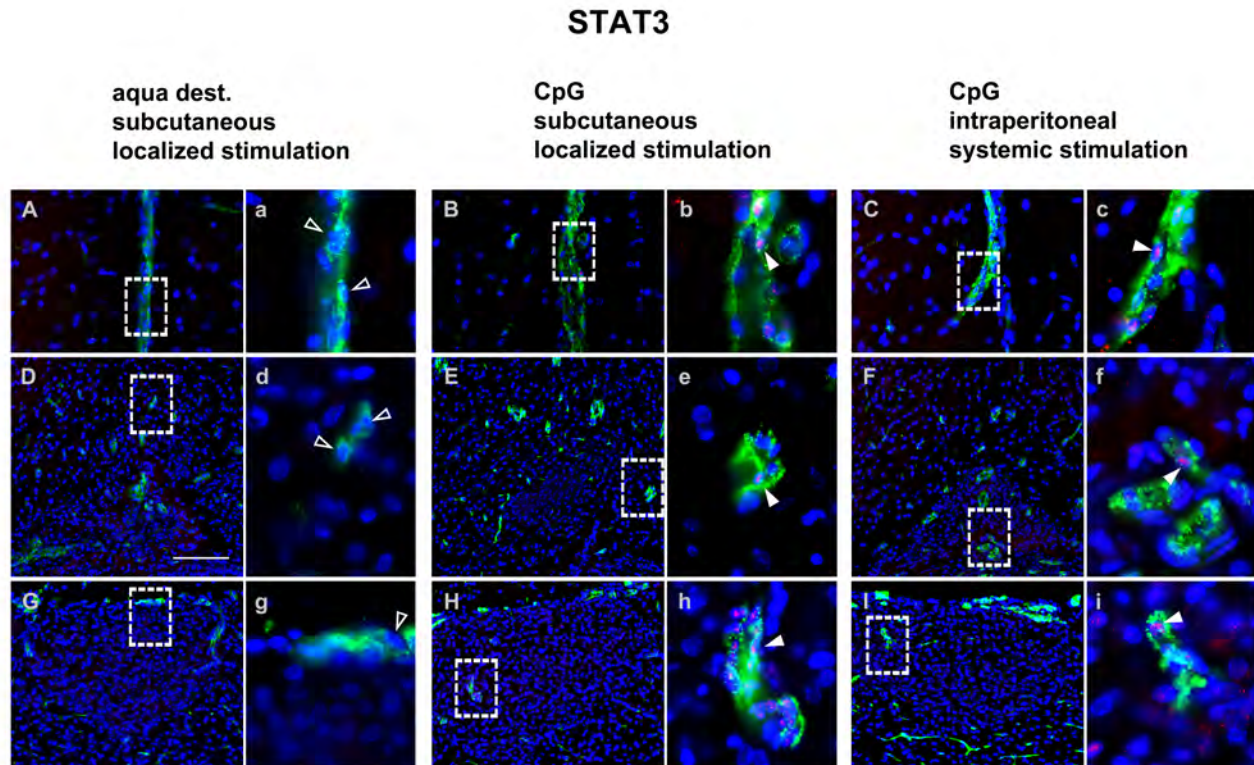


Abb. 50: Nukleäre Immunreaktivität von STAT3 in Cortex (A - C), OVLT (D - F) und AP (G - I) zwei Stunden nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Aqua ad injectionem. Die Kontrollgruppe zeigte keine nukleäre STAT3 Translokation. Die Teilabbildungen a - i sind stärker vergrößerte Fotografien der gekennzeichneten Areale aus A - I. Der Eichbalken in D entspricht in A - C 50 μ m, in D - I 100 μ m und in a - i 20 μ m. Ausgefüllte Pfeilköpfe weisen auf STAT3 positive, offene Pfeilköpfe auf STAT3 negative Endothelzellen. Farbkomponenten: mit DAPI angeführte Zellkerne (blau), STAT3 Signale (rot), Zellmarker für Endothelzellen „von-Willebrand-Faktor“ (grün).

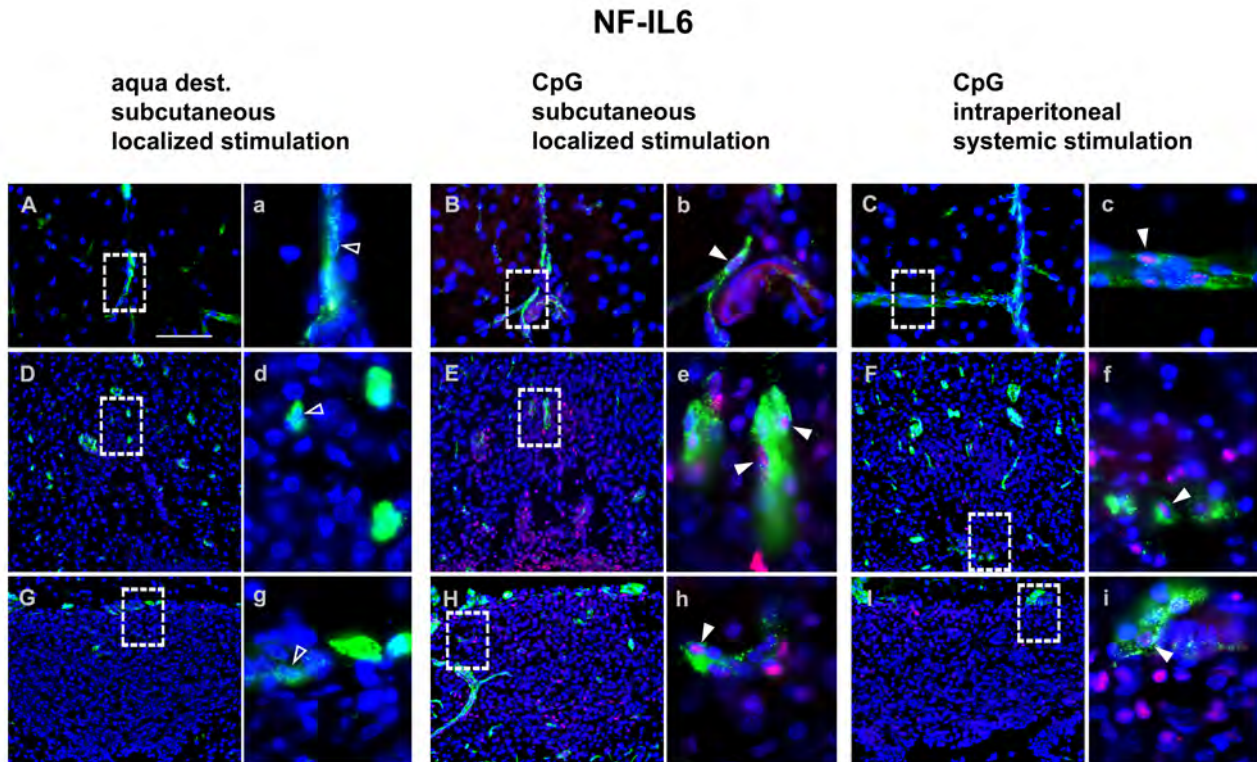


Abb. 51: Nukleäre Immunreaktivität von NF-IL6 in Cortex (A - C), OVLT (D - F) und AP (G - I) sechs Stunden nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Stimulation mit ODN 1668 (5 mg/kg) oder dem Lösungsmittel Aqua ad injectionem. Die Kontrollgruppe zeigte keine nukleäre NF-IL6 Translokation. Die Teilabbildungen a - i sind stärker vergrößerte Fotografien der gekennzeichneten Areale aus A - I. Der Eichbalken in A entspricht in A - C 50 µm, in D - I 100 µm und in a - i 20 µm. Ausgefüllte Pfeilköpfe weisen auf NF-IL6 positive, offene Pfeilköpfe auf NF-IL6 negative Endothelzellen. Farbkomponenten: mit DAPI angefärbte Zellkerne (blau), STAT3 Signale (rot), Zellmarker für Endothelzellen „von-Willebrand-Faktor“ (grün).

3.3 ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG DER ENDOSOMALEN TLR 7 UND 9 AGONISTEN UND IHRER WIRKUNG

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei physiologischen und molekularen Reaktionen der lokal (SC) oder systemisch (IP) behandelten Ratten starke Parallelen (z.B. stärkere lokale als systemische Wirkung), aber auch einige Unterschiede (z.B. Stärke der IFN Expression oder der STAT3 / NF-IL6 Aktivierung) zwischen einer TLR 7 und TLR 9 Stimulation aufgezeigt wurden, deren mögliche Ursachen im Folgenden diskutiert werden.

4 DISKUSSION

4.1 ZENTRALNERVÖS KONTROLLIERTE KRANKHEITSSYMPTOME NACH LOKALER (SC) ODER SYSTEMISCHER (IP) STIMULATION MIT ENDOSOMALEN TLR AGONISTEN

Die endosomalen TLR Agonisten Imiquimod (TLR 7) und ODN 1668 (TLR 9) verursachten nach Anwendung an Ratten dosisabhängig zwei der charakteristischen zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptome, Fieber und Anorexie, welche sich abhängig von der Applikationsart und der verwendeten Substanz, unterschieden. Verglichen mit anderen TLR Agonisten (LPS, MALP-2, FSL-1, Poly I:C), welche diesbezüglich im Mikrogramm Bereich ($\mu\text{g/kg}$) eingesetzt untersucht wurden, waren die auf Ebene der Krankheitssymptome induzierten Effekte moderat, obwohl beide hier vorgestellten Substanzen im Milligramm Bereich (mg/kg) appliziert werden mussten, um die genannten Effekte zu erzielen. Die Gabe einer vergleichbaren Menge LPS führt bei Ratten zu einem septischen Schockzustand, der zumindest in der Anfangsphase von Hypothermie (Töllner et al., 2000) begleitet ist und Futter- und Wasseraufnahme zeitweise komplett unterdrückt.

Erstmals konnten wir beobachten, dass durch lokale (SC) Injektion eines TLR Agonisten ein stärkerer Effekt auf die zentralnervös kontrollierten Komponenten der APR ausgelöst wurde, als durch die systemische (IP) Applikation. Da bisher alle diesbezüglich untersuchten Substanzen nach lokaler (SC) Applikation einen wesentlich geringeren oder keinen Effekt auf die Körpertemperatur und das „sickness behaviour“ hatten (siehe Tab. 15) ging man davon aus, dass eine Pyrogeninjektion in ein subkutan Kompartiment generell geringere Effekte auslöst als die systemische Injektion. Dieses Phänomen steht in Zusammenhang damit, dass nach systemischer (IP) Gabe von LPS, MALP-2 oder Poly I:C wesentlich höhere Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen im Blut auftreten, als nach lokaler (SC) Applikation, und dass für beide Applikationswege offensichtlich unterschiedliche Signalwege zur Induktion von Fieber oder Anorexie aktiviert werden (Hübschle et al., 2006; Knorr et al., 2008, 2010; Rummel et al., 2004; Voss et al., 2006). Die hier vorgestellten Ergebnisse demonstrieren somit:

1. Dass TLR 7 und 9 in der Subkutis exprimiert werden, was nicht für alle TLRs der Fall ist. So führte der TLR 3 Agonist, Poly I:C, nach Injektion in eine subkutan implantierte Kammer weder zu einer Fieberreaktion noch zu lokaler Zytokinbildung. Nach systemischer (IP) Injektion war Poly I:C allerdings sehr wohl in der Lage, zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome von beträchtlicher Intensität zu induzie-

ren (Voss et al., 2006). Dies lässt den Schluss zu, dass TLR 3 in der Subkutis nicht exprimiert wird oder Poly I:C in diesem Kompartiment seinen Rezeptor nicht in ausreichender Konzentration erreichen kann. Die ebenfalls in endosomalen Kompartimenten lokalisierten TLRs 7 und 9 scheinen dagegen im Bereich der *Subcutis* exprimiert und von den in den „airpouch“ injizierten Liganden Imiquimod und ODN 1668 erreicht zu werden. Als zelluläre Ziele für Agonisten der TLRs 7 und 9 wurden in erster Linie Makrophagen und dendritische Zellen identifiziert (Blasius & Beutler, 2010). Letztere sind im subkutanen Raum in hoher Dichte vorzufinden, wo sie unter anderem wichtige Beiträge zur Antigenpräsentation leisten.

2. Dass es sich bei Imiquimod und ODN 1668 um die ersten diesbezüglich untersuchten PAMPs handelt, die in der Lage sind, von einem lokalen Entzündungsort aus stärkere zentralnervös kontrollierte Krankheitssymptome hervorzurufen, als nach systemischer (IP) Applikation. Die Gründe hierfür sind in der speziellen Kombination peripherer und zentral induzierter Mediatoren zu suchen, die wir im Rahmen unserer Untersuchung nachweisen konnten.

TLR Agonist	Systemische Reaktion	Lokale Reaktion	Septischer Schock
<i>LPS (TLR 4)</i>	+++	++	+++
<i>MALP-2 (TLR 2/6)</i>	++	++	+
<i>FSL-1 (TLR 2/6)</i>	++	nicht untersucht	+/-
<i>POLY I:C (TLR 3)</i>	++	-	-
<i>Imiquimod (TLR 7)</i>	+	++	-
<i>ODN 1668 (TLR 9)</i>	+	++	-

Tab. 15: Semiquantitative Auswertung der Kapazität verschiedener in unserer Arbeitsgruppe getesteter TLR Agonisten, eine systemische oder lokale inflammatorische Reaktion hervorzurufen bzw. einen septischen Schockzustand auszulösen.

1V136, ein TLR 7 Agonist, wie das von uns getestete Imiquimod, löste nach intranasaler Applikation bei Mäusen eine Hypothermie und Anorexie aus (Hayashi et al., 2008). In einer

weiteren an Mäusen durchgeführten experimentellen Studie (Kozak et al., 2006) wurde die Fähigkeit von CpG DNA zur Fieberinduktion dokumentiert. Unsere mit Ratten durchgeführten Untersuchungen lassen sich bezüglich der physiologischen Daten wie folgt zusammenfassen:

Am Injektionstag verursachten Imiquimod und ODN 1668 in der hohen Dosierung (5 mg/kg) eine signifikante Erhöhung der Körpertemperatur und eine partielle Anorexie (Imiquimod und ODN 1668) bzw. eine partielle Adipsie (ODN 1668 nach IP Injektion). In der niedrigen Dosierung (1 mg/kg) war lediglich nach Stimulation mit ODN 1668 bei lokaler (SC) Applikation eine signifikant erhöhte Körpertemperatur zu verzeichnen. Bei den anderen Versuchsgruppen war dagegen nur eine Tendenz zur Erhöhung der Körpertemperatur erkennbar. Die Futter- und Wasseraufnahme blieb durch die Injektion der niedrigen Dosis beider TLR Agonisten unbeeinflusst.

Der unterschiedliche Einfluss der beiden TLR Agonisten auf Hunger- bzw. Durstgefühl ist besonders bemerkenswert, da beide TLRs auf Endosomen exprimiert werden und beide die gleichen Moleküle zur Signaltransduktion rekrutieren (siehe Kap. 1.1.4).

Die hypothalamischen Kerngebiete, welche für die Regulation der Futter- bzw. Wasseraufnahme zuständig sind, können zum Beispiel nach Stimulation mit Imiquimod oder ODN 1668 unterschiedlich stark angesprochen werden. Dies könnte damit zu tun haben, dass die von Adipsie begleitete systemische (IP) Injektion von ODN 1668 im Vergleich zu Imiquimod zu einem deutlich höheren IL-6-Spiegel im Blutplasma führte. Für IL-6 wurde wiederum in früheren Studien gezeigt, dass es besonders stark am Subfornikalen Organ (Harre et al., 2003) und dem hypothalamischen Nucleus Supraopticus (Rummel et al., 2004) zellulär wirksam ist. Beide Gehirnareale spielen eine besonders wichtige Rolle für die Homöostase des Flüssigkeitshaushalts (McKinley et al., 2003). Um dies zu beweisen, müssten jedoch weitere detaillierte Untersuchungen dieser ZNS Strukturen unter dem Einfluss einer Stimulation mit TLR 7 und 9 Agonisten durchgeführt werden.

Bekanntermaßen ist eine von Fieber begleitete inflammatorische Reaktion ebenfalls durch verminderte Aktivität (Lethargie) gekennzeichnet (Bluthé et al., 1992; Harden et al., 2006; Hübschle et al., 2006; Kent et al., 1992). In unserem Fall trat die erhöhte Körpertemperatur infolge von Imiquimod und ODN 1668 Applikation in der ersten Lichtphase unmittelbar nach der Injektion auf. Interessanterweise konnte lediglich nach lokaler (SC) Injektion von Imiquimod (hohe Dosis) und ODN 1668 (niedrige Dosis) in dieser Lichtphase ein signifikanter Unterschied in der motorischen Aktivität zwischen fiebernden Tieren und den Tieren der Kontrollgruppen festgestellt werden. Bei allen mit Pyrogen behandelten Tieren war der physiologische Rhythmus vermehrter Aktivität während der Dunkelphase und verminderter

Aktivität während der Hellphase erhalten. Vergleicht man die Aktivitätswerte der fiebernden Tiere mit den Aufzeichnungen der vorangegangenen und der folgenden Tage, stellt sich für jeweils die selbe Gruppe die kumulative Aktivität als äusserst homogen dar und es kam zu keiner detektierbaren Lethargie während der ersten Hell- bzw. Dunkelphase nach der Injektion. Es kann also festgestellt werden, dass weder Imiquimod noch ODN 1668 nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Injektion zu verminderter Aktivität führen, wenn man die Aktivität der jeweiligen Tiergruppen an den Tagen vor der Stimulation zum Vergleich heranzieht.

Da ein wichtiger Aspekt der hier vorgelegten Studie die Charakterisierung potentieller Nebenwirkungen therapeutisch einsetzbarer endosomaler TLR Agonisten auf den Säugetierorganismus ist, soll bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass durch Imiquimod und ODN 1668 ein bemerkenswert geringes Maß zentralnervös kontrollierter Krankheitssymptome ausgelöst wurde, obwohl beide Substanzen in vergleichsweise hohen Dosierungen getestet wurden.

4.2 PERIPHERE ZYTOKININDUKTION NACH LOKALER (SC) ODER SYSTEMISCHER (IP) STIMULATION MIT ENDOSOMALEN TLR AGONISTEN

Endosomale TLR Agonisten führen über Bindung an ihren Rezeptor zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und letztlich zur Produktion von Typ I IFN (IFN α und IFN β) (O'Brien et al., 2010; Rajagopal et al., 2010). Nach topischer Behandlung mit Imiquimod haltiger Creme wurde jedoch auch die vermehrte Expression von Typ II IFN (IFN γ) in Mammatumoren beschrieben (Lu et al., 2009). Unsere Messung der IFN Expression in den peripheren Organen Leber und Milz ergab bei den mit Imiquimod behandelten Ratten eine massive Erhöhung der IFN Expression in der Milz nach lokaler (SC) Injektion in den airpouch. Bei den mit ODN 1668 behandelten Tieren war die Erhöhung der IFN Expression in den peripheren Organen deutlich schwächer ausgeprägt oder sogar nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der Übertritt des relativ kleinen Imiquimod Moleküls in den Blutkreislauf und sein Transport in die Milz. Dies hätte allerdings auch für das in die Bauchhöhle injizierte Imiquimod zutreffen können. Möglicherweise wurde die Substanz in der Bauchhöhle in größerem Umfang durch peritoneale Makrophagen aufgenommen.

Für das vergleichsweise größere ODN 1668 Molekül könnte sich der Übertritt aus der subkutanen Luftblase in die Zirkulation schwieriger gestaltet haben, was die niedrigere INF

Expression in der Milz verursacht haben könnte. Ausserdem ist nicht bekannt, ob sich die Dichte an TLR 7 bzw. TLR 9 Rezeptoren in den untersuchten Organen deutlich unterscheidet. Die prominente Erhöhung der IFN γ Expression korreliert mit der Tatsache, dass Typ II IFN proinflammatorische und pyrogene Eigenschaften zugeschrieben werden (Chen & Ivashkiv, 2010; Kluger, 1991; Morimoto et al., 1987), und wir nach Injektion von Imiquimod ein leichtes Fieber beobachten konnten. Dagegen werden IFN α antipyretische Eigenschaften zugesprochen, wie durch eine Studie an Frettchen demonstriert werden konnte. Hier führte die intranasale Applikation von IFN α zu einer kompletten Unterdrückung des Infektionsbegleitenden Fiebers im Rahmen einer artifiziell induzierten Influenza Infektion (Kugel et al., 2009).

Im nächsten Schritt gelang uns der Nachweis einer signifikanten Menge immunreaktiven IFN γ in der Lavageflüssigkeit und im Blutplasma von mit Imiquimod behandelten Ratten. Nach der Injektion von ODN 1668 kam es lediglich zu einem tendenziellen, nicht signifikanten Anstieg der IFN γ Konzentration. Als potentieller humoraler Botenstoff, der zur Induktion von zentralnervös kontrollierten Krankheitssymptomen beitragen könnte, kommt IFN γ daher in erster Linie für die Versuche mit dem TLR 7 Agonisten Imiquimod in Frage. Zur Klärung dieser Frage könnten Untersuchungen beitragen, in denen Versuchstiere zusätzlich zu Imiquimod mit einem spezifischen IFN γ Antiserum behandelt werden.

Weiterhin wurden die Entzündungsmediatoren IL-6 und TNF α in Blutplasma und Lavageflüssigkeit nach Stimulation mit endosomalen TLR Agonisten gemessen, welche eine wichtige Rolle bei der Signalvermittlung lokaler und systemischer Entzündungsprozesse zum Gehirn spielen (Conti et al., 2004; Kluger, 1991; Roth & DeSouza, 2001). Das Ausmaß der Zytokinbildung nach Applikation der beiden Pyrogene stimmte mit dem durch die telemetrischen Untersuchungen entstandenen Bild weitgehend überein. Verglichen mit anderen TLR Agonisten (Hübschle et al., 2006; Miller et al., 1997; Roth et al., 2004), welche ebenfalls ein höheres Fieber induzierten, fiel die Induktion proinflammatorischer Zytokine vergleichsweise moderat aus. Die in einer früheren Studie getesteten TLR Agonisten MALP-2 und FSL-1 führten bereits in deutlich geringeren Dosierungen zu einer etwa zehnfach stärkeren Induktion von TNF α und IL-6. Des Weiteren wurden durch beide Substanzen nach systemischer (IP) Injektion signifikant höhere Zytokinwerte verursacht, als durch lokale (SC) Applikation (Knorr et al., 2008). Noch gravierender stellt sich der Unterschied zwischen den hier eingesetzten Substanzen und dem TLR 4 Agonisten LPS dar. Die lokale und systemische Zytokininduktion nach entsprechender Stimulation mit LPS ist nochmals

mindestens um den Faktor Zehn höher als nach lokaler (SC) oder systemischer (IP) Applikation von MALP-2 oder FSL-1 (Ross et al., 2000; 2003; Rummel et al., 2004).

Die von uns detektierten, relativ geringen, Zytokinwerte passen gut zu den milden Symptomen der durch Imiquimod und ODN 1668 ausgelösten Entzündungsreaktion. Nach lokaler (SC) Injektion der endosomalen TLR Agonisten waren IL-6, TNF α und IFN γ teilweise im Blutplasma nachzuweisen (siehe Tab. 16). Wir gehen davon aus, dass in diesen Fällen ein Übertritt der Zytokine in den Blutkreislauf stattgefunden hat. Dies stimmt mit Untersuchungen überein, in welchen ein Übertritt von endogenen Pyrogenen aus einem lokalen Kompartiment nach SC Injektion von LPS festgestellt wurde (Miller et al., 1997; Ross et al., 2003; Roth et al., 2000). Speziell im Fall der lokalen (SC) Injektion von Imiquimod können wir jedoch nicht ausschließen, dass der TLR 7 Agonist selbst in signifikanter Menge ins Blut gelangte und auch andere Organe, z.B. die Milz, zur Bildung von Zytokinen angeregt hat.

	Imiquimod	ODN 1668
<i>IL-6</i>	+	+
<i>TNFα</i>	+	-
<i>IFNγ</i>	+	-

Tab. 16: Qualitative Bewertung des Auftretens von Zytokinen in der Zirkulation nach lokaler (SC) Injektion endosomaler TLR Agonisten.

Trotz der relativ geringen Menge klassischer Zytokine in der Zirkulation, kann die Beteiligung dieser an der Induktion der Fieberreaktion und des „sickness behaviour“ nach Stimulation mit endosomalen TLR Agonisten nicht ausgeschlossen werden, da sie auch im lokalen Entzündungsgebiet gegenüber den Kontrollgruppen signifikant erhöht waren (siehe Kap. 1.2.2). Allerdings scheinen sie hier eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.3 EFFEKTE ENDOSOMALER TLR AGONISTEN AUF DAS GEHIRN (CVOs / HYPOTHALAMUS)

Anhand der direkten Reaktivität von neuroglialen Zellen des OVLT (Ott et al., 2010) und AP (Wuchert et al., 2008) auf LPS mit einem intrazellulären Anstieg der Calcium Ionen Konzentration in bestimmten Zellpopulationen konnten wir in früheren Studien die funktio-

nelle Aktivierung des TLR 4 in diesen Gehirnstrukturen nachweisen. Auch die Existenz von TLR 7 und 9 in Mikrogliazellen und Astrozyten des Gehirns wurde inzwischen nachgewiesen und eine Beteiligung dieser Rezeptoren an angeborenen Immunreaktionen innerhalb des ZNS beschrieben (Butchi et al., 2010).

Dennoch scheint es fraglich, ob die von uns eingesetzten TLR Agonisten Imiquimod bzw. ODN 1668 direkte Effekte auf zellulärer Ebene im Bereich des Hypothalamus entfalten konnten, da wir dort im Rahmen unserer Messungen (im Gegensatz z.B. zur Milz) keinen signifikanten Anstieg der IFN Expression nachweisen konnten.

Wahrscheinlicher ist, dass die in der Peripherie gebildeten proinflammatorischen Zytokine (TNF, IL-6, IFN γ und andere) im Hypothalamus zur Induktion der Signalkaskade beigetragen haben, die über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Bildung weiterer Zytokine führt. Eine Reihe von Studien beschreibt dieses Phänomen als „zweite Zytokinwelle“ (Dantzer, 2001; Plata-Salaman, 1998; Sachot et al., 2004; Teeling et al., 2007). Diese „zweite Welle“ wirkt im Folgenden auf die nachgeschalteten Temperaturregulationszentren im vorderen Hypothalamus bzw. auf diejenigen Kerngebiete, die im Dienste der Nahrungsaufnahme oder des Trinkverhaltens stehen. Die Expression von TNF α , IL-1 und IL-6 war nach Injektion der endosomalen TLR Agonisten im vorderen Hypothalamus teilweise moderat, aber signifikant erhöht. Zentral gebildetes TNF α (Palin et al., 2007), IL-1 (Fortier et al., 2004; Harden et al., 2011; Takács et al., 2008) und IL-6 (Chai et al., 1996; Soares et al., 2011) wird mit der Induktion von Fieber, Anorexie und Adipsie in Zusammenhang gebracht.

Die im Bereich des vorderen Hypothalamus gebildete „zweite Welle“ an Zytokinen hat neben direkten Effekten auf thermosensitive und thermoregulierende Neurone, sowie auf solche, die für die Kontrolle der Futter- und Wasseraufnahme zuständig sind, eine zentrale Aufgabe: sie verursachen die Bildung und Freisetzung des zentralen Fiebermediators PGE₂. Aus folgenden Gründen wird PGE₂ als Schlüsselenzym der Fieberentstehung angesehen.

1. Mikroinjektionen von ins PGE₂ zentrale Ventrikelsystem (Milton & Wendlandt, 1971), oder direkt in den Hypothalamus (Scammell et al., 1996), führen zu schnell einsetzenden Fieberreaktionen.
2. Die Konzentrationen an PGE₂ im Blut (Milton, 1998) und im Hypothalamus (Sehic & Blatteis, 1996) steigen parallel zum Fieberverlauf an.
3. Pharmaka, die als Hemmstoffe der Prostaglandinsynthese wirken, unterdrücken effektiv das Fieber (Roth & DeSouza, 2001; Roth et al., 2009; Zeisberger & Roth, 1999).

PGE₂ ist ein Derivat der Arachidonsäure, die durch Phospholipase A₂ aus Zellmembranen freigesetzt wird. Im zweiten Schritt wird Arachidonsäure durch Zyklooxygenase (COX) zu PGH₂ umgewandelt. Im letzten Schritt erfolgt die Isomerisierung zu PGE₂ durch Prostaglandin E Synthasen (PGES). COX 2 und mPGES sind induzierbare Formen dieser Enzyme, die transkriptionell durch NF-κB (Turrin & Serge Rivest, 2004) oder STAT3 (Rummel et al., 2004, 2011) reguliert werden. Im am besten untersuchten Modell des LPS Fiebers konnte demonstriert werden, dass die Expression von COX 2 und mPGES im Gehirn gesteigert wird und sie zellulär kolokalisiert sind (Yamagata et al., 2001). Eine kritische Rolle für beide Enzyme bei der Fieberentstehung wurde auch dadurch nachgewiesen, dass COX 2 bzw. mPGES „knockout“ Mäuse kein Fieber nach Stimulation mit LPS entwickeln können (Engblom et al., 2003; S Li et al., 1999; Saha et al., 2005; Steiner et al., 2005).

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche gelang es erstmals, im Hypothalamus nach Injektion der endosomalen TLR 7 und 9 Agonisten eine erhöhte Expression der beiden oben genannten Enzyme zu detektieren, welche nach Stimulation mit ODN 1668 im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ausfiel, als nach Stimulation mit Imiquimod. Man kann demzufolge davon ausgehen, dass auch durch periphere Behandlung mit Imiquimod und sogar in stärkerem Umfang ODN 1668, im Hypothalamus eine verstärkte Bildung von PGE₂ zu verzeichnen ist. Die *de novo* Synthese von PGE₂ im Hypothalamus hat mit hoher Wahrscheinlichkeit die beobachteten Fieberreaktionen vermittelt, obwohl von einigen Autoren postuliert wird, dass peripher (nicht zentral) gebildetes PGE₂ zumindest für die Initialphase des Fiebers wichtiger ist (Blatteis, 2006; Steiner et al., 2006).

Bevor die für die Induktion der Entzündung nötigen Zielgene abgelesen werden, kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche als Proteine im Zytoplasma von Endothel- und anderen Zellen der CVOs vorliegen und nach Stimulation in den Nukleus translokieren (siehe Kap. 1.4.1). Dort können sie mit Hilfe indirekter Immunhistochemie sichtbar gemacht und als Maß der Aktivierung herangezogen werden.

Auf mRNA Ebene waren die Transkriptionsfaktoren STAT3, NF-IL6 und NF-κB (gezeigt über I-κB) im vorderen Hypothalamus nach Stimulation mit Imiquimod bzw. ODN 1668 moderat erhöht. Zytokine aktivieren die frühen Marker der entzündlichen Reaktion, NF-κB (aktiviert durch IL-1) und STAT3 (aktiviert durch IL-6) wie durch frühere Studien belegt werden konnte (Harre et al., 2002; 2003; Nadjar et al., 2003; Rummel et al., 2008).

Korrespondierend zu den vergleichsweise niedrigen Zytokinwerten in Plasma und Lavage und der moderaten Erhöhung auf mRNA Ebene detektierten wir lediglich einzelne STAT3

und NF- κ B positive Endothelzellen im Bereich des OVLT, der AP sowie des Cortex nach Stimulation mit endosomalen TLR Agonisten.

Der erst kürzlich mit zentralen Entzündungsprozessen in Verbindung gebrachte Transkriptionsfaktor NF-IL6 (C/EBP γ) (Damm et al., 2011) zeigte nach Stimulation mit Imiquimod ein räumlich und zeitliches Verteilungsmuster, das bereits nach zwei Stunden deutlich zu erkennen und nach sechs Stunden massiv ausgebildet war. NF-IL6 scheint eine Rolle bei der TLR vermittelten Aktivierung von Zytokinen zu spielen (Lu et al., 2009). Erstaunlicherweise kam es nach Behandlung mit ODN 1668 nicht zu einer vergleichbaren Aktivierung NF-IL6 positiver Zellen, sondern lediglich zu vereinzelt Signalen in den untersuchten Hirnregionen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die bereits an Makrophagen (Dudarek et al., 2011) und dem ZNS (Witwer et al., 2009) demonstrierte Fähigkeit von IFN, NF-IL6 zu aktivieren. Kausalität zwischen der Aktivierung von NF-IL6 und der durch Imiquimod bzw. ODN 1668 gesteigerten IFN Expression können wir anhand unserer Befunde lediglich postulieren, nicht jedoch beweisen. Hierzu wäre es erforderlich, Versuchstiere mit IFN zu behandeln und eine Aktivierung von NF-IL6 zu dokumentieren. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die massive Aktivierung von NF-IL6 auch mit der Stärke der Krankheitssymptome korrelierte; stärkeres Fieber und deutlichere NF-IL6 Aktivierung nach lokaler (SC) Gabe der TLR Agonisten.

4.3.1 EIN ZUSÄTZLICHER, ALTERNATIVER SIGNALWEG NACH LOKALER (SC) STIMULATION MIT TLR 7 UND 9 AGONISTEN

Allein anhand der zirkulierenden Konzentrationen an humoralen Signalüberträgern in das Gehirn (IL-6, TNF, IFN γ) lässt sich das von uns beobachtete Phänomen der stärkeren ZNS Reaktion nach lokaler (SC) Stimulation mit Imiquimod bzw. ODN 1668 nicht erklären. Es wurde jedoch ein zweiter, neuronaler Signalweg zur Fieberentstehung postuliert (Blatteis, 2006; Roth & DeSouza, 2001), der auf einer lokalen Stimulation afferenter Nervenfasern durch lokal gebildete Entzündungsmediatoren beruht. Im Bereich der Bauchhöhle werden in diesem Zusammenhang in erster Linie Afferenzen des *Nervus vagus* diskutiert (Dantzer et al., 2008; Goldbach et al., 1997; Roth & DeSouza, 2001; Watkins et al., 1995).

Es konnte allerdings in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sich die Fieberreaktion, die durch lokale (SC) Injektion von LPS in eine subkutane Kammer induziert wird, durch simultane subkutane Gabe eines Lokalanästhetikums abschwächen lässt (Ross et al., 2000).

Dieser Befund wurde so interpretiert, dass lokal (SC) gebildete Mediatoren wie Zytokine oder PGE_2 auch sensorische Hautafferenzen aktivieren können, welche in gewissem Umfang einen Beitrag zur inflammatorischen Signalübertragung in das Gehirn leisten. Unterstützung für eine solche Hypothese wurde von anderen Studien geliefert, in denen die Ausschaltung afferenter C-Fasern durch Capsaicin, ZNZ kontrollierte Krankheitssymptome abschwächen (Székely et al., 1997; Watanabe et al., 1994)

Da die in unseren Versuchen eingesetzten TLR Agonisten beide in der Lage waren, im Bereich der subkutanen Luftblase eine signifikante Induktion an lokal wirksamen Mediatoren zu induzieren, könnte man auch hier die Aktivierung eines zweiten Signalwegs vermuten. Die Ereignisse, die nach lokaler (SC) Injektion von Imiquimod zu stärkeren Aktivierungen von NF-IL6 und anderen Mediatoren im Gehirn und damit auch zu etwas stärkeren Krankheitssymptomen geführt haben könnten, sind schematisch in Abb. 52 zusammengefasst.

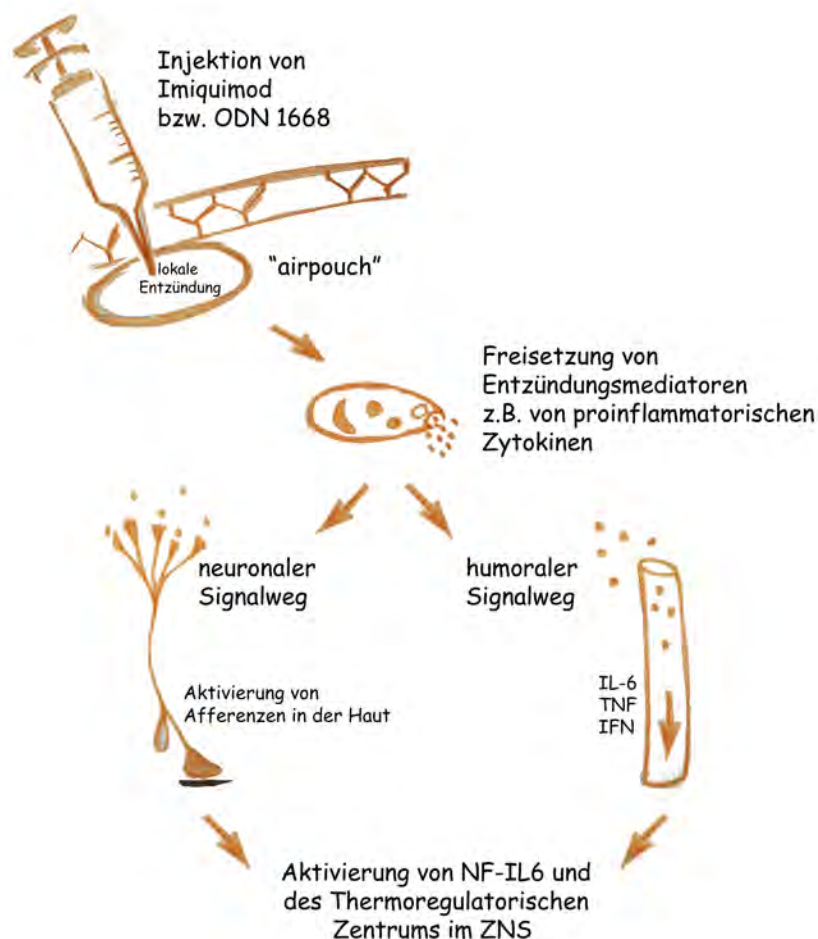


Abb. 52: Vereinfachte schematische Darstellung der Signalwege, die für die Fieberinduktion nach subkutaner Applikation von Imiquimod oder ODN 1668 verantwortlich sind.

Da der zweite Signalweg über Hautafferenzen bei systemischer (IP) Stimulation fehlt, wäre dies eine Möglichkeit, einen unserer Kernbefunde zu erklären, nämlich die stärkeren Reaktionen nach lokaler (SC) im Vergleich zur systemischen (IP) Stimulation mit TLR 7 und 9 Agonisten. Die endgültige Verifizierung dieser Hypothese erfordert jedoch weiterführende Untersuchungen.

4.4 THERAPEUTISCHES POTENTIAL VON ENDOSOMALEN TLR AGONISTEN

Die Fähigkeit von TLRs, angeborene und auch erworbene Immunität maßgeblich beeinflussen zu können, macht sie zu attraktiven therapeutischen Zielstrukturen. Auf die bereits praktizierte Anwendung von Imiquimod und CpG DNA wurde bereits in der Einleitung verwiesen. Aufgrund der erstaunlich geringen Nebenwirkungen, die beide Substanzen nach lokaler (SC) und systemischer (IP) Injektion hervorrufen, ist eine therapeutische Anwendung denkbar (siehe Kap. 1.1.2). Das Auftreten eines septischen Schockzustandes, wie es nach Injektion von LPS (Steiner et al., 2011) oder MALP-2 (Schmidt et al., 2007) vorkommen kann, ist nach den von uns gewonnenen Erkenntnissen ausgeschlossen. Nutzbringend könnte es sein, die von uns getesteten Substanzen auf Gebieten, in welchen eine unspezifische Stimulation des Immunsystems erwünscht bzw. notwendig ist, einzusetzen. Vorstellbar wäre ein Einsatz als Impfadjuvans oder in der Therapie verschiedener Tumorarten, um diese durch Größenreduktion in einen operablen Zustand zu versetzen. Imiquimod wurde bereits topisch mit gutem Erfolg in der Behandlung verschiedener kutaner und subkutaner Neoplasien eingesetzt und ein Einsatz zur Bekämpfung epithelialer Mikrometastasen bei Ovarial Krebs ist angedacht (Kast & Altschuler, 2008). Hierzu wäre eine abdominale Lavage mit Imiquimodhaltiger Lösung notwendig. Aufgrund der geringen, durch Imiquimod induzierten Nebenwirkungen nach systemischer (IP) Applikation, könnte dieser Ansatz unserer Meinung nach ebenso vielversprechend sein, wie die bereits praktizierte topische Behandlung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

HINTERGRUND UND ZIELSETZUNG

Toll-like Rezeptoren (TLRs) des angeborenen Immunsystems erkennen konservierte Molekülstrukturen pathogener Mikroorganismen. Die TLRs 7 und 9 sind in Anlehnung an ihre Aufgabe einzelsträngige virale RNA bzw. intrazellulär auftretende bakterielle oder virale DNA zu erkennen, im endosomalen Kompartiment bestimmter Zellen lokalisiert. Die synthetischen TLR 7 bzw. 9 Agonisten Imiquimod und ODN 1668 werden bereits als Immunadjuvantien oder zur topischen Behandlung von Hautkrebserkrankungen eingesetzt. Demzufolge sind detaillierte Informationen über mögliche Nebenwirkungen dieser Substanzen dringend erforderlich. Daher wurden die Konsequenzen einer lokalen subkutanen (SC) oder systemischen intraperitonealen (IP) Injektion von Imiquimod / ODN 1668 bei Ratten untersucht. Analysiert wurden hierbei die Entstehung von Fieber und Krankheitsverhalten, sowie die periphere und zentralnervöse (hypothalamische) Induktion einer breiten Palette an proinflammatorischen Molekülen.

METHODIK

Ratten wurden SC (in eine subkutan angelegte Luftblase) oder IP mit Imiquimod / ODN 1668 in Dosierungen von 1 bzw. 5 mg/kg Körpergewicht behandelt. Körpertemperatur, motorische Aktivität sowie Futter- und Trinkwasseraufnahme wurden telemetrisch erfasst und ausgewertet. Periphere und zentralnervöse Bildung proinflammatorischer Moleküle wurden mittels RT-PCR, Bioassays, ELISAs und Immunhistochemie / Immunfluoreszenz experimentell untersucht.

KERNBEFUNDE

Bei Imiquimod und ODN 1668 handelt es sich um die bislang ersten diesbezüglich untersuchten TLR-Agonisten, bei denen sich Fieber und Anorexie in stärkerem Umfang nach lokaler (SC) verglichen mit systemischer (IP) Stimulation manifestieren. Periphere Induktion von Interferonen (IFNs) und zirkulierende Konzentrationen anderer potentieller endogener Pyrogene (TNF α , IL-6) korrelierten mit der jeweiligen Stärke der untersuchten Krankheitssymptome. Während Imiquimod eine stärkere Kapazität zur Induktion von IFNs, besonders IFN γ , zeigte, verursachte eine Behandlung mit ODN 1668 höhere zirkulierende IL-6-Konzentrationen. Im Gehirn (Hypothalamus) war nach Stimulation mit beiden Substanzen eine

erhöhte Expression von Zytokinen (TNF α , IL-1 β , IL-6) und den induzierbaren Formen der Enzyme zur Prostaglandin E₂-Synthese (COX 2, mPGES) nachweisbar. Dies war von einer moderaten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3 und einer starken Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-IL6 begleitet, besonders in Zellen von Hirnregionen mit unvollständiger Blut-Hirn-Schranke und in stärkerem Ausmaß nach SC verglichen mit IP Stimulation der Versuchstiere. Korrelierend zur peripheren Bildung von IFN γ bzw. IL-6, verursachte Imiquimod eine stärkere Aktivierung von NF-IL6, während die IL-6-vermittelte nukleäre Translokation von STAT3 nach Behandlung mit ODN 1668 stärker ausfiel.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Selbst bei Einsatz vergleichsweise hoher Dosierungen verursacht eine Behandlung mit den endosomalen TLR 7 / 9-Agonisten Imiquimod und ODN 1668 nur moderate ZNS-kontrollierte Krankheitssymptome. Diese scheinen in Zusammenhang mit peripherer Bildung von IFN γ / IL-6 zu stehen und werden möglicherweise durch eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-IL6 / STAT3 verursacht, die wiederum für eine intrahypothalamische Bildung eines Cocktails proinflammatorischer Mediatoren verantwortlich sind. Verglichen mit anderen TLR-Agonisten, sind die Krankheitssymptome, die nach SC oder IP Behandlung mit Imiquimod entstehen als relativ schwach einzustufen. Das völlige Fehlen eines septischen Zustands nach Gabe von Imiquimod oder ODN 1668 lässt die therapeutische Einsetzbarkeit beider Substanzen als relativ unbedenklich erscheinen.

6 SUMMARY

BACKGROUND AND PURPOSE

Toll-like receptors (TLRs) of the innate immune system recognize conserved molecular patterns associated with microbial pathogens. TLRs 7 and 9 are located in the endosomal compartments due to their task to sense single stranded viral RNA (TLR 7) or intracellular bacterial or viral CpG-DNA. The synthetic TLR 7 and TLR 9 agonist imiquimod and ODN 1668 are used as immuoadjuvants or for topical treatment of skin cancers. According to these circumstances detailed information about possible side effects of these drugs are warranted. Therefore, the consequences of local subcutaneous (SC) or systemic intraperitoneal (IP) injections of imiquimod / ODN 1668 on the manifestation of fever, sickness behaviour, and the peripheral and brain-intrinsic induction of a variety of inflammatory molecules were investigated in rats.

EXPERIMENTAL APPROACH

Rats were given SC (subcutaneous airpouch) or IP imiquimod / ODN 1668 (1 or 5 mg·kg⁻¹). Body temperature, motor activity, food and water intake were recorded by telemetric devices. Peripheral and brain-intrinsic (hypothalamic) induction of inflammatory mediators was analyzed by RT-PCR, bioassays, ELISAs and immunohistochemistry / immunofluorescence.

KEY RESULTS

Imiquimod and ODN 1668 are the first TLR-agonist investigated, which have stronger effects on fever and anorexia after its SC as compared to IP administration. Peripheral induction of interferons (IFNs) and putative circulating pyrogens (TNF, IL-6) corresponded to the strength of the illness responses. While imiquimod showed stronger capacities to induce IFNs, namely IFN γ , ODN 1668 induced higher levels of circulating IL-6. In the brain (hypothalamus), an expression of cytokines (TNF α , IL-1 β , and IL-6) and inducible forms of enzymes for prostaglandin E₂ synthesis (COX 2, mPGES) occurred, which was accompanied by a moderate activation of the transcription factors NF- κ B and STAT3 and a strong activation of the transcription factor NF-IL6, namely in cells of specific sites with an open blood-brain barrier, again to a higher degree in SC treated rats. Corresponding to the peripheral induction of IFN γ and / or IL-6, imiquimod caused stronger activation of NF-IL6,

while the IL-6 mediated nuclear translocation of STAT3 was more pronounced in response to ODN 1668.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Even when given at a high dose, imiquimod and ODN 1668 cause rather moderate brain-inflammatory responses, which are related to peripheral IFN / IL-6-expression and possibly mediated by brain-intrinsic activation of NF-IL6 / STAT3 and the induction of a proinflammatory cocktail within the hypothalamus. Compared to other TLR-agonists, brain-controlled illness responses are rather moderate after SC or IP treatment of rats with imiquimod or ODN 1668. The lack of a septic state in imiquimod or ODN 1668-treated rats reinforces therapeutic use of these drugs.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D & Kushnery I (2003).** Overexpressed nuclear factor- κ B can participate in endogenous C-reactive protein induction, and enhances the effects of C / EBPb and signal transducer and activator of transcription-3. *Immunology*, 65, 1-9.
- Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas R, & Wagner H (2002).** Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *European Journal of Immunology*, 32(7), 1958-1968.
- Akazawa T, Inoue N, Shime H, Kodama K, Matsumoto M & Seya T (2010).** Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: Development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Science*, 101(7), 1596-603.
- Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K (1994).** Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, 77(1), 63-71.
- Akira S (1997).** IL-6-regulated Transcription Factors. *Science*, 29(12).
- Akira S & Hemmi H (2003).** Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology Letters*, 85(2), 85-95.
- Akira S & Takeda K (2004).** Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 4(7), 499-511.
- Alexopoulou L, Holt CA, Medzhitov R & Flavell RA (2001).** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-738.
- Alonzi T, Fattori E, Cappelletti M, Ciliberto G, & Poli V (1998).** Impaired Stat3 activation following localized inflammatory stimulus in IL-6-deficient mice. *Cytokine*, 10(1), 13-18.
- Andersson J, Nagy S, Björk L, Abrams J, Holm S & Andersson U (1992).** Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunological Reviews*, 127, 69-96.
- Azuma I (1992).** Inducer of cytokines in vivo: overview of field and romurtide experience. *International Journal of Immunopharmacology*, 14(3), 487-96.

- Baeuerle PA & Baltimore D (1988).** Specific Inhibitor of the Transcription Factor. *Sciences-New York*, 242(1987).
- Banks WA, Ortiz L, Plotkin SA & Kastin AJ (1991).** Human Interleukin (IL) la , Murine IL-la and Murine IL-lf Are Transported from Blood to Brain in the Mouse by a Shared Saturable Mechanism¹. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 988-996.
- Banks WA, Kastin AJ & Gutierrez EG. (1994).** Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neuroscience Letters*, 179, 53-6.
- Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H (2001).** Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 9237-42.
- Bazan JF (1990).** Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunology Today*, 11(10), 350-4.
- Bemelmans MH, van Tits LJ & Buurman WA (1996).** Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Critical Reviews in Immunology*, 16(1), 1-11.
- Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F & Besedovsky H (1987).** Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science*, 238(4826), 524-6.
- Bhattacharya S & Schindler C (2003).** Regulation of Stat3 nuclear export. *Biotechnology*, 111(4), 553-559.
- Bird AP (1986).** CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321(6067), 209-13.
- Blasius AL & Beutler B (2010).** Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3), 305-15.
- Blatteis CM, Bealer SL, Hunter WS, Llanos J, Ahokas RA & Mashburn TA (1983).** Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Research Bulletin*, 11(5), 519-26.
- Blatteis CM (2006).** Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(1), 194-223.
- Bluthé RM, Dantzer R & Kelley KW (1992).** Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Research*, 573(2), 318-20.

- Bluthé RM, Michaud B, Kelley KW & Dantzer R (1996).** Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *Neuroreport*, 7(15-17), 2823-7.
- Breder CD, Hazuka C, Ghayurt T, Klug C, Huginint M, Yasuda K, Tengii M (1994).** Regional induction of. *Neurobiology*, 91, 11393-11397.
- Butchi NB, Du M & Peterson KE (2010).** Interactions between TLR7 and TLR9 agonists and receptors regulate innate immune responses by astrocytes and microglia. *Glia*, 58(6), 650-64.
- Caldenhoven E, Buitenhuis M, van Dijk TB, Raaijmakers JAM, Lammers JWJ, Koenderman L & de Groot RP (1999).** Lineage-specific activation of STAT3 by interferon- γ in human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 65, 391-396.
- Cao C, Matsumura K, Shirakawa N, Maeda M, Jikihara I, Kobayashi S & Watanabe Y (2001).** Pyrogenic cytokines injected into the rat cerebral ventricle induce cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells and also upregulate their receptors. *European Journal of Neuroscience*, 13(9), 1781-90.
- Cao C, Matsumura K, Yamagata K & Watanabe Y (1997).** Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. *American Journal of Physiology*, 272, R1712-1725.
- Carswell, EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975).** An Endotoxin-Induced Serum Factor that Causes Necrosis of Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(9), 3666-3670.
- Cartmell T, Poole S, Turnbull AV, Rothwell NJ & Luheshi GN (2000).** Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *Journal of Physiology*, 526 Pt 3, 653-61.
- Chai BZ, Gatti S, Toniatti C & Bartfai T (1996).** Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, 183, 311- 316.
- Chedid, L (1983).** Muramyl peptides as possible endogenous immunopharmacological mediators. *Microbiology and Immunology*, 27(9), 723-32.
- Chen J & Ivashkiv LB (2010).** IFN- γ abrogates endotoxin tolerance by facilitating Toll-like receptor-induced chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45) 19438–19443.

- Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, Cella M (2004).** Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 34(3), 796-805.
- Coceani F, Lees J, Mancilla J, Belizario J & Dinarello CA (1993).** Interleukin-6 and tumor necrosis factor in cerebrospinal fluid: changes during pyrogen fever. *Brain Research*, 612(1-2), 165-71.
- Conti B, Tabarean I, Andrei C & Bartfai T (2004).** Cytokines and Fever. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1433-49.
- Coons A (1958).** Fluorescent antibody methods. *General Cytochemical Methods*, 1, 399 - 422.
- Cooper AL, Brouwer S, Turnbull AV, Luheshi GN, Kunkel SL & Rothwell J (1994).** Tumor necrosis factor- α and fever after peripheral inflammation in the rat. *American Journal of Physiology*, 267, R1431-1436.
- Cunningham ET, Wada E, Carter DB, Tracey DE, Battey JF & De Souza EB (1992).** In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *The Journal of Neuroscience*, 12(3), 1101-14.
- Damm J, Luheshi GN, Gerstberger R, Roth J & Rummel C (2011).** Spatiotemporal nuclear factor interleukin-6 expression in the rat brain during lipopolysaccharide-induced fever is linked to sustained hypothalamic inflammatory target gene induction. *Journal of Comparative Neurology*, 519(3), 480-505.
- Dantzer R (2001).** Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain, Behavior and Immunity*, 15(1), 7-24.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW & Kelley KW (2008).** From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 46-56.
- Davidson J, Abul H, Milton A & Rotondo D (2001).** Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E₂ entry into the brain. *Pflügers Archiv*, 442(4), 526-533.
- Dejardin E, Derogowski V, Chapelier M, Jacobs N, Gielen J, Merville M & Bours V (1999).** Regulation of NF- κ B activity by I κ B-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 18(16), 2567-77.

- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S & Sousa CR (2004).** Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303(5663), 1529-31.
- Dinarello CA (2004).** Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *Journal of Endotoxin Research*, 10(4), 201-22.
- Dudaronek JM, Barber SA & Janice E (2011).** CUGBP1 Is Required for IFN β -Mediated Induction of Dominant-Negative CEBP β and Suppression of SIV Replication in Macrophages. *Journal of Immunology*, 2007(179) 7262-7269.
- Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K (2003).** Impaired response to interferon- α / β and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nature Genetics*, 33, 388-391.
- Engblom D, Saha S, Engström L, Westman M, Audoly LP, Jakobsson P-J & Blomqvist A (2003).** Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1137-8.
- Ericsson A, Liu C, Hart RP & Sawchenko PE (1995).** Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *Journal of Comparative Neurology*, 361(4), 681-98.
- Espevik T & Nissen-Meyer J (1986).** A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *Journal of Immunological Methods*, 95(1), 99-105.
- Findlay GM & MacCallum FO (1937).** An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 44(2), 405-424.
- Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM & Brennan FM (1998).** Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF- α : role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Journal of Immunology*, 160(2), 920-8.
- Fortier M-E, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P & Luheshi GN (2004).** The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287(4), R759-66.

- Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME & Fontana A (1989).** On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *European Journal of Immunology*, 19(4), 689-94.
- Fry M & Ferguson AV (2007).** The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. *Physiology & Behavior*, 91(4), 413-23.
- Gebke E, Müller AR, Pehl U & Gerstberger R (2000).** Astrocytes in sensory circumventricular organs of the rat brain express functional binding sites for endothelin. *Neuroscience*, 97(2), 371-81.
- Gerstberger R, Müller AR & Simon-Oppermann C (1992).** Functional hypothalamic angiotensin II and catecholamine receptor systems inside and outside the blood-brain barrier. *Progress in Brain Research*, 91, 423-33.
- Ghosh S & Karin M (2002).** Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle. *Cell*, 109(2), S81-S96.
- Goldbach J, Roth J & Zeisberger E (1997).** Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy depends on the route of pyrogen vagotomy administration in guinea pigs. *American Journal of Physiology*, 272, R675-681.
- Greis A, Murgott J, Gerstberger R, Hübschle T & Roth J (2009).** Effects of repeated injections of fibroblast-stimulating lipopeptide-1 on fever, formation of cytokines, and on the responsiveness to endotoxin in guinea-pigs. *Acta Physiologica*, 197(1), 35-45.
- Greis A, Murgott J, Rafalzik S, Gerstberger R, Hübschle T & Roth J (2007).** Characterization of the febrile response induced by fibroblast-stimulating lipopeptide-1 in guinea pigs. *American Journal of Physiology*, 293(1), R152-61.
- Guidotti LG & Chisari FV (2000).** Cytokine-Mediated Control of Viral Infections. *Nature*, 227, 221-227.
- Gutierrez EG, Banks WA & Kastin AJ (1993).** Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of Neuroimmunology*, 47(2), 169-76.
- Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S & Wagner H (2000).** Immune Cell Activation by Bacterial Cpg-DNA through Myeloid Differentiation Marker 88 and Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor (Traf)6. *Journal of Experimental Medicine*, 192(4), 595-600.

- Harden LM, du Plessis I, Poole S & Laburn HP (2006).** Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Physiology & Behavior*, 89(2), 146-55.
- Harden LM, du Plessis I, Roth J, Loram LC, Poole S & Laburn HP (2011).** Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 β and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 36(5), 608-22.
- Harkin A, O'Donnell JM & Kelly JP (2002).** A study of VitalView for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats. *Physiology & Behavior*, 77(1), 65-77.
- Harrison CJ, Miller RL & Bernstein DI (2001).** Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine. *Antiviral Research*, 19, 1820-1826.
- Harre EM, Roth J, Pehl U, Kueth M, Gerstberger R. & Hübschle T (2002).** Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *Journal of Applied Physiology*, 92, 2657-2666.
- Harre EM, Roth J & Hübschle T (2003).** Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Research*, 980, 151-155.
- Hayashi T, Cottam HB, Chan M, Jin G, Tawatao RI, Crain B, & Ronacher L (2008).** Mast cell-dependent anorexia and hypothermia induced by mucosal activation of Toll-like receptor 7. *American Journal of Physiology*, 295(1), R123-32.
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F & Graeve L (1998).** Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal*, 334, 297-314.
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K & Horiuchi T (2002).** Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88 – dependent signaling pathway. *Energy*, 3(2), 196-200.
- Hopkins PA & Sriskandan S (2005).** Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clinical and Experimental Immunology*, 395-407.

- Hori T, Shibata M, Nakashima T, Yamasaki M, Asami A, Asami T & Koga H (1988).** Effects of interleukin-1 and arachidonate on the preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Brain Research Bulletin*, 20(1), 75-82.
- Hornef MW, Normark BH, Vandewalle A & Normark S (2003).** Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 198(8), 1225-35.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T & Endres S (2002).** Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology*, 168(9), 4531-4537.
- Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T & Heeg K (1998).** CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *The EMBO Journal*, 17(21), 6230-40.
- Hübschle T, Thom E, Watson A, Roth J, Klaus S & Meyerhof W (2001).** Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *Journal of Neuroscience*, 21(7), 2413-24.
- Hübschle T, Mütze J, Mühlradt PF, Korte S, Gerstberger R & Roth. (2006).** Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and -6 agonists MALP-2 and FSL-1. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(1), R180-7.
- Ibelgaufts H (1995).** Dictionary of cytokines. *VCH Verlag, Weinheim*.
- Isaacs A & Lindenmann J (1987).** Virus interference. I. The interferon. *Journal of Interferon Research*, 7(5), 429-38.
- Kano A, Wolfgang MJ, Gao Q, Jacoby J, Chai G-X, Hansen W & Iwamoto Y (2003).** Endothelial cells require STAT3 for protection against endotoxin-induced inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 198(10), 1517-25.
- Kast E & Altschuler E (2008).** Intraperitoneal lavage with imiquimod to eliminate epithelial ovarian cancer micro metastases. *Medical Hypotheses*, 70(6), 1223.
- Kawai T & Akira S (2005).** Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Research & Therapy*, 7(1), 12-9.

- Kemp DJ, Smith DB, Foote SJ, Samaras N & Peterson MG (1989).** Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), 2423-7.
- Kent S, Bluthé RM, Kelley KW & Dantzer R (1992).** Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13(1), 24-8.
- Kielian T (2006).** Review Toll-Like Receptors in Central Nervous System Glial Inflammation and Homeostasis. *Journal of Neuroscience Research*, 730, 711-730.
- Kishimoto T, Hibi M, Murakami M, Narazaki M, Saito M & Taga T (1992).** The molecular biology of interleukin 6 and its receptor. *Ciba Foundation Symposium*, 167, 5-16.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J & Schindler CW (2002).** Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285 (1-2), 1-24.
- Klinman D, Takeno M, Ichino M, Gu M, Yamshchikov G, Mor G & Conover J (1997).** DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Seminars in Immunopathology*, 19(2), 245-56.
- Kluger MJ (1991).** Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiological Reviews*, 71(1), 93-127.
- Knorr C, Hübschle T, Murgott J, Mühlradt P, Gerstberger R & Roth J (2008).** Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. *Brain Research*, 1205, 36-46.
- Knorr C, Marks D, Gerstberger R, Mühlradt P, Roth J & Rummel C (2010).** Peripheral and central cyclooxygenase (COX) products may contribute to the manifestation of brain-controlled sickness responses during localized inflammation induced by macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2). *Neuroscience Letters*, 479(2), 107-11.
- Kobe B & Deisenhofer J (1995).** A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, 374(6518), 183-6.
- Konat GW, Kielian T & Marriottà I (2006).** The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. *Journal of Neurochemistry*, 99, 1-12.

- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK & Langer JA (2003).** IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology*, 4(1), 69-77.
- Kozak W, Zheng H, Conn CA, Soszynski D, van der Ploeg LH & Kluger MJ (1995).** Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *American Journal of Physiology*, 269(5 Pt 2), R969-77.
- Kozak W, Wrotek S & Kozak A (2006).** Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear factor-kappaB. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(4), R871-80.
- Kugel D, Kochs G, Obojes K, Roth J, Kobinger GP, Kobasa D & Haller O (2009).** Intranasal administration of alpha interferon reduces seasonal influenza A virus morbidity in ferrets. *Journal of Virology*, 83(8), 3843-51.
- Kunder SC, Kelly KM & Morahan PS (1993).** Biological response modifier-mediated resistance to herpesvirus infections requires induction of alpha/beta interferon. *Antiviral Research*, 21(2), 129-39.
- Laflamme N & Rivest S (2001).** Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *The FASEB Journal*, 15(1), 155-163.
- Laflamme N, Soucy G & Rivest S (2001).** Circulating cell wall components derived from gram-negative , not gram-positive , bacteria cause a profound induction of the gene-encoding Toll-like receptor 2 in the CNS. *Journal of Neurochemistry*, 79, 648-657.
- Lansdorp PM, Aarden LA, Calafat J & Zeiljemaker WP (1986).** A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 132, 105-13.
- Layé S, Gheusi G, Cremona S, Combe C, Kelley K, Dantzer R & Parnet P (2000).** Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. *American Journal of Physiology*, 279(1), R93-8.
- Lee J, Chuang T, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA & Raz E (2003).** Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: Activation of Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6646–6651.

- Lemaitre B (1993).** Focus on TLR Signalling, The road to Toll. *Immunology*, 1-7.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J & Hoffmann JA (1996).** The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle* / Toll / cactus Controls the *spa* Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, 86, 973-983.
- Levy DE, Kessler DS, Pine R, Reich N & Darnell JE (1988).** Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes & Development*, 2(4), 383-393.
- Li S, Wang Y, Matsumura K, Ballou LR, Morham SG & Blatteis CM (1999).** The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Research*, 825(1-2), 86-94.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-8.
- Lu Y-C, Kim I, Lye E, Shen F, Suzuki N, Suzuki S & Gerondakis S (2009).** Differential role for c-Rel and C/EBPbeta/delta in TLR-mediated induction of proinflammatory cytokines. *Journal of Immunology*, 182(11), 7212-21.
- Luheshi G, Miller J, Brouwer S, Dascombe M, Rothwell N & Hopkins J (1996).** Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. *American Journal of Physiology*, 270, E91-95.
- Maimone D, Cioni C, Rosa S, Macchia G, Aloisi F & Annunziata P (1993).** Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha. *Journal of Neuroimmunology*, 47(1), 73-81.
- Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S & Allavena P (2001).** Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends in Immunology*, 22(6), 328-36.
- Marshall JD, Fearon KL, Higgins D, Hessel EM, Kanzler H, Abbate C & Yee P (2005).** Superior Activity of the Type C Class of ISS In Vitro and In Vivo Across Multiple Species. *DNA and Cell Biology*, 24(2), 63-72.
- Matsumura K, Watanabe Y, Imai-Matsumura K, Connolly M, Koyama Y & Onoe H (1992).** Mapping of prostaglandin E2 binding sites in rat brain using quantitative autoradiography. *Brain Research*, 581(2), 292-8.

- Matsumura K, Watanabe Y, Onoe H & Hayaishi O (1990).** High density of prostaglandin E2 binding sites in the anterior wall of the 3rd ventricle: a possible site of its hyperthermic action. *Brain Research*, 533(1), 147-51.
- Matsumura K & Kobayashi S (2004).** Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Frontiers in Bioscience*, 9, 2819-26.
- McKinley M, Gerstberger R, Mathai M, Oldfield B & Schmid H (1999).** The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *Journal of Clinical Neuroscience*, 6(4), 289-301.
- McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ (2003).** The Sensory Circumventricular Organs of the Mammalian Brain. *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology. Springer*, 172.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P & Janeway CA (1997).** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-7.
- Miller AJ, Hopkins SJ & Luheshi GN (1997).** Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 1274-1279.
- Miller CHT, Maher SG & Young HA (2009).** Clinical Use of Interferon-gamma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1182, 69-79.
- Milton AS (1998).** Prostaglandins and fever. *Progress in Brain Research*, 115, 129-39.
- Milton B & Wendlandt S (1971).** Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *Journal of Physiology*, 218, 325-336.
- Miyake K (2007).** Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 19(1), 3-10.
- Morimoto BYA, Murakami N, Teshirogi S & Watanabe T (1987).** Fever and acute phase response induced in Rabbits by Humen Recombinant Interferon Gamma. *Journal of Physiology*, 1, 209-218.
- Mosmann T (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

- Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, van Heeckeren A & Prince A (2004).** Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 30(6), 777-83.
- Mullis KB & Faloona FA (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-50.
- Nadeau S & Rivest S (1999).** Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience*, 93(4), 1449-64.
- Nadjar A, Bluthé R-M, May MJ, Dantzer R & Parnet P (2005).** Inactivation of the cerebral NFkappaB pathway inhibits interleukin-1beta-induced sickness behavior and c-Fos expression in various brain nuclei. *Neuropsychopharmacology*, 30(8), 1492-9.
- Nadjar A, Combe C, Layé S, Tridon V, Dantzer R, Amédée T & Parnet P (2003).** Nuclear factor κ B nuclear translocation as a crucial marker of brain response to interleukin-1. A study in rat and interleukin-1 type I deficient mouse. *Journal of Neurochemistry*, 87(4), 1024-1036.
- Nakamura K, Kaneko T, Yamashita Y, Hasegawa H, Katoh H & Negishi M (2000).** Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 421(4), 543-69.
- Nakamura K, Matsumura K, Hübschle T, Nakamura Y, Hioki H, Fujiyama F, Boldogkői Z, König M, Thiel H-J, Gerstberger R, Shigeo K & Kaneko T (2004).** Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *Journal of Neuroscience*, 24(23), 5370-80.
- Nathan CF (1987).** Neutrophil Activation on Biological Surfaces Massive Secretion of Hydrogen Peroxide in Response to Products of Macrophages and Lymphocytes intermediates. *Cancer Research*, 80, 1550-1560.
- Nickel, R., Schummer, A., & Seiferle, E. (1992).** Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- Olson JK & Miller SD (2004).** Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *Journal of Immunology*, 173(6), 3916-24.

- Ott, D, Murgott J, Rafalzik S, Wuchert F, Schmalenbeck B, Roth J & Gerstberger R (2010).** Neurons and glial cells of the rat organum vasculosum laminae terminalis directly respond to lipopolysaccharide and pyrogenic cytokines. *Brain Research*, 1363, 93-106.
- O'Brien K, Fitzgerald D, Rostami A & Gran B (2010).** The TLR7 agonist, imiquimod, increases IFN-beta production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 221(1-2), 107-11.
- Pace J, Russel S, Blanc PA & Murasko DM (1985).** Comparative effects of various classes of mouse interferons on macrophage activation for tumor cell killing. *Journal of Immunology*, 134(2), 977-81.
- Palin K, Bluthé R-M, McCusker RH, Moos F, Dantzer R & Kelley KW (2007).** TNFalpha-induced sickness behavior in mice with functional 55 kD TNF receptors is blocked by central IGF-I. *Journal of Neuroimmunology*, 187(1-2), 55-60.
- Pestka S, Krause CD & Walter MR (2004).** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, 202, 8-32.
- Pietra LD, Bressan A, Pezzotti AR & Serlupi-Crescenzi O (1998).** Highly conserved amino-acid sequence between murine STAT3 and a revised human STAT3 sequence. *Gene*, 213(1-2), 119-24.
- Plata-Salaman C (1998).** Cytokine-Induced Anorexia. *Annals of the New York Academy of Science*, 856, 160-70.
- Platanias LC (2005).** Interferon Signals: What Is Classical and What Is Nonclassical? *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 25(12), 732.
- Poli V (1998).** The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29279-82.
- Poltorak A (1998).** Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*, 282(5396), 2085-2088.
- Poupart P, Vandenabeele P, Cayphas S & Snick JV (1987).** B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF). *EMBO Journal*, 6(5), 1219-1224.
- Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch (2004).** (260th ed.). de Gruyter.

- Quirion R, Dalpé M & Dam TV (1986).** Characterization and distribution of receptors for the atrial natriuretic peptides in mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(1), 174-8.
- Rajagopal D, Paturel C, Morel Y, Uematsu S, Akira S & Diebold SS (2010).** Plasmacytoid dendritic cell-derived type I interferon is crucial for the adjuvant activity of Toll-like receptor 7 agonists. *Blood*, 115(10), 1949-57.
- Ramji DP & Foka P (2002).** CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochemical Journal*, 365(Pt 3), 561-75.
- Ranels HJ & Griffin JD (2003).** The effects of prostaglandin E2 on the firing rate activity of thermosensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Research*, 964(1), 42-50.
- Razin A & Friedman J (1981).** DNA methylation and its possible biological roles. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 25, 33-52.
- Rivest S, Lacroix S, Vallières L, Nadeau S, Zhang J & Laflamme N (2000).** How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223(1), 22-38.
- Romanovsky AA, Simons CT, Szekely M, Kulchitsky VA, Steiner AA, Molchanova AY & Dogan MD (1997).** The vagus nerve in the thermoregulatory response to systemic inflammation. *American Journal of Physiology*, 273(1 Pt 2), R407-13.
- Ross G, Roth J, Störr B, Voigt K & Zeisberger E (2000).** Afferent nerves are involved in the febrile response to injection of LPS into artificial subcutaneous chambers in guinea pigs. *Physiology & Behavior*, 71(3-4), 305-13.
- Ross G, Hübschle T, Pehl U, Braun H-A, Voigt K, Gerstberger R & Roth J (2003).** Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *Journal of Applied Physiology*, 94(4), 1395-402.
- Roth J & De Souza GE (2001).** Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(3), 301-14.
- Roth J, Goldbach JM, Störr B & Zeisberger E (1997).** Studies on the role of tumor necrosis factor alpha in the responses to bacterial pyrogenic stimuli. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 813, 255-63.

- Roth J, Martin D, Störr B & Zeisberger E (1998).** Neutralization of pyrogen-induced tumour necrosis factor by its type 1 soluble receptor in guinea-pigs: effects on fever and interleukin-6 release. *The Journal of Physiology*, 509, Pt 1, 267-75.
- Roth J, Harré E-M, Rummel C, Gerstberger R & Hübschle T (2004).** Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Frontiers in Bioscience*, 9, 290-300.
- Roth J, Hübschle T, Pehl U, Ross G & Gerstberger R (2002).** Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea-pigs. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 443(3), 411-7.
- Roth J, Rummel C, Barth SW, Gerstberger R & Hübschle T (2006).** Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Neurologic Clinics*, 24(3), 421-39.
- Roth J, Rummel C, Barth SW, Gerstberger R & Hübschle T (2009).** Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 29(2), 229-45.
- Roth J, Störr B, Martin D, Voigt K & Zeisberger E (2000).** The Role of Local Induction of Tumor Necrosis Factor by LPS within a Subcutaneous Air Pouch in the Development of a Febrile Response in Guinea Pigs. *Neuroimmunomodulation*, 169-176.
- Rothwell NJ (1991).** Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(11), 430-6.
- Rummel C, Hübschle T, Gerstberger R & Roth J (2004).** Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation. *Journal of Physiology*, 557(Pt 2), 671-87.
- Rummel C, Inoue W, Sachot C, Poole S, Hübschle T & Luheshi GN (2008).** Selective contribution of interleukin-6 and leptin to brain inflammatory signals induced by systemic LPS injection in mice. *Journal of Comparative Neurology*, 511(3), 373-95.
- Rummel C, Matsumura K, Luheshi GN (2011).** IL-6 contributes to peripheral LPS-induced mPGES-1 expression in the rat brain. *Brain Research Bulletin*, in press.
- Rummel C, Sachot C, Poole S & Luheshi GN (2006).** Circulating interleukin-6 induces fever through a STAT3-linked activation of COX-2 in the brain. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(5), R1316-26.

- Rummel C, Voss T, Matsumura K, Korte S, Gerstberger R, Roth J & Hübschle T (2005).** Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *Journal of Comparative Neurology*, 491(1), 1-14.
- Sachot C, Poole S & Luheshi GN (2004).** Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. *Journal of Physiology*, 561(Pt 1), 263-72.
- Sachs L (2004).** *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Saha S, Engström L, Mackerlova L, Jakobsson P-J & Blomqvist A (2005).** Impaired febrile responses to immune challenge in mice deficient in microsomal prostaglandin E synthase-1. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(5), R1100-7.
- Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P., & Vale, W. (1987).** Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*, 238(4826), 522-4.
- Scammell TE, Elmquist JK, Griffin JD & Saper CB (1996).** Ventromedial preoptic prostaglandin E2 activates fever-producing autonomic pathways. *Journal of Neuroscience*, 16(19), 6246-54.
- Schiltz JC & Sawchenko PE (2003).** Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Frontiers in Bioscience*, 8, 1321-9.
- Schindler C (1995).** Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 621-51.
- Schindler C, Fu XY, Improtta T, Aebersold R & Darnell JE (1992).** Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91-and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7836-9.
- Schmidt J, Welsch T, Jäger D, Mühlradt PF, Büchler MW & Märten A (2007).** Intratumoural injection of the toll-like receptor-2/6 agonist "macrophage-activating lipopeptide-2" in patients with pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *British Journal of Cancer*, 97(5), 598-604.
- Schnare M, Rollinghoff M & Qureshi S (2006).** Toll-like receptors: sentinels of host defence against bacterial infection. *International Archives of Allergy and Immunology*, 139(1), 75-85.

- Schreiber RD & Farrar MA (1993).** The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Annual Review of Immunology*, 11, 571-611.
- Sehic E & Blatteis C (1996).** Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. *Brain Research*, 726(1-2), 160-6.
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE & Kuestner R (2003).** IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Cytokine*, 4(1), 63-68.
- Shi Z, Cai Z, Sanchez A, Zhang T, Wen S, Wang J & Yang J (2010).** A novel toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4517-4524.
- Shimizu Y, Karamatsu K, Matsubara A & Yasutomi Y (2008).** [Innovation of vaccine adjuvants]. *Nihon Rinsho*, 66(10), 1915-21.
- Soares DM, Figueiredo MJ, Martins JM, Machado RR, Sorgi C, Faciolli LH, Alves-Filho JC, Cunha FQ & Souza GEP (2011).** A crucial role for IL-6 in the CNS of rats during fever induced by the injection of live *E. coli*. *Medical Microbiology and Immunology*, 2011 Jun 5. [Epub ahead of print].
- Steiner AA, Ivanov AI, Serrats J, Hosokawa H, Phayre AN, Robbins JR & Roberts JL (2006).** Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biology*, 4(9), e284.
- Steiner AA, Molchanova AY, Dogan MD, Patel S, Pétervári E, Balaskó M, Wanner SP (2011).** The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. *Journal of Physiology*, 589(Pt 9), 2415-31.
- Steiner AA, Rudaya AY, Robbins JR, Dragic AS, Langenbach R & Romanovsky AA (2005).** Expanding the febrigenic role of cyclooxygenase-2 to the previously overlooked responses. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(5), R1253-7.
- Strober W, Murray PJ, Kitani A & Watanabe T (2006).** Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature Reviews. Immunology*, 6(1), 9-20.
- Stromberg H, Svensson SP & Hermanson O (2000).** Distribution of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 in the rat central nervous system and dorsal root ganglia. *Brain Research*, 853(1), 105-14.

- Sugimoto Y, Shigemoto R, Namba T, Negishi M, Mizuno N, Narumiya S & Ichikawa A (1994).** Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP3 in the mouse nervous system. *Neuroscience*, 62(3), 919-28.
- Székelly M, Balaskó M & Romanovsky A (1997).** Peripheral neural inputs. Their role in fever development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 813, 427-34.
- Taga T (1992).** The interleukin-6 signal transducer, gp130, functioning in immune, hematopoietic, and neural systems. *Nippon Rinsho*, 50(8), 1802-10.
- Takács G, Lukáts B, Papp S, Szalay C & Karádi Z (2008).** Taste reactivity alterations after IL-1 β microinjection into the ventromedial hypothalamic nucleus of the rat. *Neuroscience Research*, 62(2), 118-22.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N & Kishimoto T (1997).** Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 3801-4.
- Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M & Klinman DM (2001).** Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 9 in CpG DNA-Induced Activation of Human Cells. *Journal of Immunology*, 167(7), 3555-3558.
- Teeling JL, Felton LM, Deacon RMJ, Cunningham C, Rawlins JNP & Perry VH (2007).** Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines. *Brain, Behavior and Immunity*, 21(6), 836-50.
- Töllner B, Roth J, Störr B, Martin D, Voigt K & Zeisberger Eugen (2000).** The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipopolysaccharide. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 440(6), 925-932.
- Turrin NP & Rivest S (2004).** Unraveling the molecular details involved in the intimate link between the immune and neuroendocrine systems. *Experimental Biology and Medicine*, 229(10), 996-1006.
- Ueno Y, Takano N, Kanegane H, Yokoi T, Yachie A, Miyawaki T & Taniguchi N (1989).** The acute phase nature of interleukin 6: studies in Kawasaki disease and other febrile illnesses. *Clinical and Experimental Immunology*, 76(3), 337-42.

- Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T & Hizaki H (1998).** Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*, 395(6699), 281-4.
- Vallières L & Rivest S (1997).** Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *Journal of Neurochemistry*, 69(4), 1668-83.
- Voss T, Rummel C, Gerstberger R, Hübschle T & Roth J (2006).** Fever and circulating cytokines induced by double-stranded RNA in guinea pigs: dependence on the route of administration and effects of repeated injections. *Acta Physiologica*, 187(3), 379-89.
- Voss T, Barth SW, Rummel C, Gerstberger R, Hübschle T & Roth J (2007).** STAT3 and COX-2 activation in the guinea-pig brain during fever induced by the Toll-like receptor-3 agonist polyinosinic:polycytidylic acid. *Cell and Tissue Research*, 328(3), 549-61.
- Wang R (1998).** Induction of Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Humans by a Malaria DNA Vaccine. *Science*, 282(5388), 476-480.
- Watanabe T, Morimoto A, Tan N, Makisumi T, Shimada SG, Nakamori T & Murakami N (1994).** ACTH response induced in capsaicin-desensitized rats by intravenous injection of interleukin-1 or prostaglandin E. *Journal of Physiology*, 475(1), 139-45.
- Watkins LR, Maier SF & Goehler LE (1995).** Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sciences*, 57(11), 1011-26.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S & Cao Z (1997).** MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Cell*, 7, 837-847.
- Witwer KW, Gama L, Li M, Bartizal CM, Queen SE, Varrone JJ & Brice AK (2009).** Coordinated regulation of SIV replication and immune responses in the CNS. *PloS One*, 4(12), e8129.
- Wuchert F, Ott D, Murgott J, Rafalzik S, Hitzel N, Roth J & Gerstberger R (2008).** Rat area postrema microglial cells act as sensors for the toll-like receptor-4 agonist lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology*, 204(1-2), 66-74.

- Wuchert F, Ott D, Rafalzik S, Roth J & Gerstberger R (2009).** Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and nitric oxide induce calcium transients in distinct populations of cells cultured from the rat area postrema. *Journal of Neuroimmunology*, 206(1-2), 44-51.
- Xin L & Blatteis CM (1992).** Hypothalamic neuronal responses to interleukin-6 in tissue slices: effects of indomethacin and naloxone. *Brain Research Bulletin*, 29(1), 27-35.
- Yamagata, K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S & Sugiura H (2001).** Coexpression of Microsomal-Type Prostaglandin E Synthase with Cyclooxygenase-2 in Brain Endothelial Cells of Rats during Endotoxin-Induced Fever. *Journal of Neuroscience*, 21(8) 2669–2677.
- Zeisberger E (1998).** From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *Journal of Thermal Biology*, 24(5-6), 287-326.
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA & Ghosh S (2004).** A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 303(5663), 1522-6.
- Zhong Z, Wen Z & Darnell JE (1994).** Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 4806-10.

8 ANHANG

8.1 DANKSAGUNG

Allen voran möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Joachim Roth, für die vorbildliche und unkomplizierte Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für Fragen, stets die richtige Antwort parat und hat durch taktile Feinarbeit in diversen Bereichen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seinem Institut anfertigen zu können und für den von ihm eingeräumten großen persönlichen Freiheitsgrad, der das Arbeiten sehr angenehm gestaltete.

Mein besonders herzlicher Dank gilt der großartigen Jelena Damm, die mit grenzenlosem Freimut Dokumentenvorlagen und Protokolle zur Verfügung stellte, welche das Arbeiten sehr erleichterten. Ohne ihre Hilfe in allen Lebenslagen wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

Des weiteren danke ich Frau Jolanta Murgott für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Assays und ELISAs.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für eine unvergleichbare Arbeitsatmosphäre.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mir das Studium ermöglichten, und durch die ich soweit kommen konnte. Ebenso allen Freunden, insbesondere Marius, die immer an meiner Seite standen.

8.2 ERKLÄRUNG

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5867-8



9 17 8 3 8 3 5 19 5 8 6 7 8 1